

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5618413号
(P5618413)

(45) 発行日 平成26年11月5日 (2014. 11. 5)

(24) 登録日 平成26年9月26日 (2014. 9. 26)

(51) Int. Cl.

F I

C 1 2 N 15/09 (2006. 01)

C 1 2 N 15/00 Z N A A

C 1 2 N 1/19 (2006. 01)

C 1 2 N 1/19

請求項の数 13 (全 41 頁)

(21) 出願番号	特願2010-528976 (P2010-528976)	(73) 特許権者	509303567
(86) (22) 出願日	平成20年10月7日 (2008. 10. 7)		シンセティック ゲノミクス、インク、
(65) 公表番号	特表2010-539994 (P2010-539994A)		アメリカ合衆国 9 2 0 3 7 カリフォル
(43) 公表日	平成22年12月24日 (2010. 12. 24)		ニア、ラ ホヤ、スイート 1 0 0、エヌ
(86) 国際出願番号	PCT/US2008/079109		. トーリー パインズ ロード 1 1 1 4
(87) 国際公開番号	W02009/048885		9
(87) 国際公開日	平成21年4月16日 (2009. 4. 16)	(74) 代理人	100102978
審査請求日	平成23年7月6日 (2011. 7. 6)		弁理士 清水 初志
(31) 優先権主張番号	60/978, 388	(74) 代理人	100102118
(32) 優先日	平成19年10月8日 (2007. 10. 8)		弁理士 春名 雅夫
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100160923
(31) 優先権主張番号	60/983, 549		弁理士 山口 裕孝
(32) 優先日	平成19年10月29日 (2007. 10. 29)	(74) 代理人	100119507
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 刑部 俊

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 大型核酸のアッセムブリー

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

下記のステップを含む所望の核酸分子の合成方法であって、

(a) 各々のカセットが所望の核酸分子の一部のヌクレオチド配列を含む複数のカセットを提供するステップ、

当該ステップ (a) において、

(i) 複数のカセットのメンバー (複数) がヌクレオチド配列の重複部分 (複数) を含み、かつ

(ii) 該カセットが、重複部分に従って組み合わせた場合に、所望の核酸分子の完全なヌクレオチド配列のサブセット (複数) を提供し、

(b) インビトロの 1 以上のステップにおいて前記複数のカセット及び任意で追加されるベクター DNA を組み合わせて、結果として形成される複数のサブセットを得るステップ
当該ステップ (b) において、

(i) 前記複数のサブセットが、少なくとも 8 0 塩基対のヌクレオチド配列の重複部分を含み、かつ、

(ii) 前記複数のサブセットが、重複部分に従って組み立てた場合に、所望の核酸分子の完全なヌクレオチド配列を提供し、

(c) インビボで宿主細胞において 1 0 個以上のサブセット及び任意に追加されるベクター DNA を組み立てて完全な所望の核酸分子を得るステップ、

当該ステップ (c) において、

10

20

宿主細胞が酵母細胞であり、かつ

前記所望の核酸分子が更に宿主細胞において作動可能な複製起点を含むこと、
を含む方法。

【請求項 2】

少なくとも 1 つの前記カセット又は追加のベクター DNA がセントロメア及び / 又は選択可能なマーカーを含むことを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

(a) 少なくとも 1 つの前記サブセット又は追加のベクター DNA が複製起点を含むこと、又は

(b) 少なくとも 1 つの前記サブセット又は追加のベクター DNA がセントロメア及び / 又は選択可能なマーカーを含むこと、又は

(c) 前記サブセット又は追加のベクター DNA が複製起点と、セントロメア及び / 又は選択可能なマーカーとを含むこと、又は、

(d) ステップ (a) において提供される少なくとも 1 つの前記カセットが透かし配列を含むこと、

を特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

インビボにおいて 10 個以上の核酸断片 (複数) を少なくとも 1 つのターゲット核酸分子に組み立てる方法であって、下記のステップ:

(a) 宿主細胞の培養物に前記 10 個以上の断片の各々の複数コピーを含む混合物を形質移入するステップ、但し、前記断片 (複数) が少なくとも 80 塩基対の重複配列 (複数) を含んで、所望の順序の組み立て物を提供し、かつ、1 以上の前記断片が少なくとも 1 つの複製起点を含み、

(b) 前記宿主細胞を培養するステップ、そして

(c) 形質移入された宿主細胞をスクリーニングして、少なくとも 1 つの前記組み立てたターゲット核酸分子の存在を確認するステップ、

を含み、宿主細胞が酵母細胞である、方法。

【請求項 5】

下記のステップ:

(i) 前記宿主細胞において 1 以上の組み立てたターゲット核酸分子を複製するステップ: 但し、前記少なくとも 1 つの複製起点の 1 つが前記宿主細胞において作動可能な複製起点であること、又は、

(ii) 前記宿主細胞から 1 以上の組み立てたターゲット核酸分子を抽出し、他の細胞に形質移入して、前記 1 以上の組み立てたターゲット核酸分子を複製するステップ: 但し、前記少なくとも 1 つの複製起点の 1 つが前記他の細胞において作動可能であること;

を更に含むことを特徴とする請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

前記宿主細胞又は前記他の細胞から、組み立てたターゲット核酸分子を単離することをさらに含むことを特徴とする請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

前記宿主細胞において、少なくとも 2 つのターゲット核酸分子を前記 10 個以上の核酸断片から組み立てることを特徴とする請求項 4 に記載の方法。

【請求項 8】

前記少なくとも 1 つの断片が前記宿主細胞又は他の細胞において作動可能なセントロメアを含むことを特徴とする請求項 4 に記載の方法。

【請求項 9】

前記少なくとも 1 つの断片が選択可能なマーカーを含み、前記培養を前記選択可能なマーカーの選択条件下で実行することを特徴とする請求項 4 に記載の方法。

【請求項 10】

前記断片が二重鎖であり、かつ 100 塩基対から 5×10^6 塩基対の長さであることを

10

20

30

40

50

特徴とする請求項 4 に記載の方法。

【請求項 1 1】

少なくとも 2 つの前記断片が、各々、1 つの末端にテロメアを含むことを特徴とする請求項 4 に記載の方法。

【請求項 1 2】

前記断片が二重鎖であり、かつ 2 0 0 塩基対から 5×10^6 塩基対の長さであることを特徴とする請求項 1 0 に記載の方法。

【請求項 1 3】

前記断片が二重鎖であり、かつ 5 0 0 塩基対から 5×10^6 塩基対の長さであることを特徴とする請求項 1 0 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【関連出願の相互参照】

【0 0 0 1】

本出願は、2 0 0 7 年 1 0 月 8 日に提出されたアメリカ合衆国仮出願 6 0 / 9 7 8 , 3 8 8、2 0 0 7 年 1 0 月 2 9 日に提出されたアメリカ合衆国仮出願 6 0 / 9 8 3 , 5 4 9、2 0 0 8 年 1 月 2 3 日に提出されたアメリカ合衆国仮出願 6 1 / 0 6 2 , 2 1 4、2 0 0 8 年 1 月 2 4 日に提出されたアメリカ合衆国仮出願 6 1 / 0 2 3 , 3 9 2、及び 2 0 0 8 年 9 月 1 1 日に提出されたアメリカ合衆国仮出願 6 1 / 0 9 6 , 2 7 0 の利益を主張する。これらの出願の内容は、本願に引用によって組み込まれる。

【技術分野】

【0 0 0 2】

本発明は、インビトロ及びインビボの組み立て（ないしアセンブル）ステップの組み合わせを採用することによって大型核酸分子を組み立てる方法、そして、酵母における複数の重複する核酸断片の組み立てに関する。この視点において、本発明は、多数の構成要素から長い DNA 分子を組み立てる酵母の能力を利用する（ないしアクセスする）ことに関する。

【背景技術】

【0 0 0 3】

自動化された段階的な合成を使用して、合理的な程度に大きい核酸分子を合成することは可能である。しかしながら、そのような方法が実用的であるための上限は、5 - 3 0 k b の大きさ（ないしオーダー）であると思われる。本願発明者らが知る最長の合成 DNA 配列は、Kodumal, S. J. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (2004) 101:15573-15578 によって報告された、3 2 k b のポリケチド合成遺伝子クラスターのものである。目的とする多くの核酸分子は、かなり大きく、純粋培地で増殖することが知られた細胞（ゲノムがおおよそ 6 0 0 k b である M. ゲニタリウム（M. genitalium））の最小のゲノムを含む。現在までに報告された完全な合成ゲノムは、ウイルスゲノムのみであり、Cello, J., et al., Science, (2003) 297:1016-1018 によるポリオウイルスの合成、Smith, H. O., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (2003) 100:15440-15445 による合成オリゴヌクレオチドから組み立てた X 1 7 4 バクテリオファージの合成、及び Blight, K. J., et al., Science (2000) 290:1972-1974 による H C V の合成を含む。

【0 0 0 4】

より大型の DNA 分子を合成することは有益だろう。1 つの応用形態（application）では、これを、必須及び必須でない遺伝子の決定の根拠を提供するために実施することができる。他の応用形態では、自然には発生しない完全な合成ゲノムを構築することができる。

【0 0 0 5】

本発明において、インビトロ及びインビボの両方の組み立て方法が採用される。インビトロの組み立て方法は、例えば、P C T / U S 2 0 0 6 / 0 3 1 3 9 4 に基づく P C T 出願公開 W O 2 0 0 7 / 0 2 1 9 4 4 及び、P C T / U S 2 0 0 6 / 0 3 1 2 1 4 に基づく P C T 出願公開 W O 2 0 0 7 / 0 3 2 8 3 7 に開示される。

10

20

30

40

50

【 0 0 0 6 】

酵母におけるインビボの組み換え(recombination)も知られている。酵母の組み換えは、その後、プラスミド及び酵母合成染色体(YACs)の構築に適用されている。1987年に、Maraは、相同領域(ないしホモロガスな領域)を含む2つの共形質転換された(co-transformed)DNA断片からプラスミドを構築した。リンカー媒介組み立て(linker mediated assembly)と呼ばれる他の工程では、酵母において、末端を架橋する短い合成リンカーを使用して、任意のDNA配列をベクターDNAに連結することができる(Raymond, C. K., et al., Biotechniques (1999) 26:134-138, 140-141; and Raymond, C. K., et al., Genome Res. (2002) 12:190-197)。同様に、4つ又は5つの重複するDNA断片を組み立て、そしてベクターDNAに連結することができ(Raymond, C. K., et al., Biotechniques (1999) 26:134-138, 140-141; and Ebersol, T., et al., Nucleic Acids Res. (2005) 33:e130)、(i)酵母細胞は複数のDNA断片(ないし部分)を取り込むことができ、(ii)相同性の酵母組み換えは、複数の断片(pieces)を単一の組み換え分子へ正確に組み入れることに十分に有効であることが実証されている。

10

【 0 0 0 7 】

以前の研究では、ベクターがヒトゲノムの分節(ないしはセグメント)の側面に末端60bpの相同性(homologies)(「hooks」)を有する場合に、ヒトゲノムの比較的大型なセグメント(>100kb)を環状酵母ベクターにクローン化できることが確立された(Noskov, V. N., et al., Nucleic Acids Res. (2001) 29:E32)。更に、酵母は、Marschall, P., et al., Gene Ther. (1999) 6:1634-1637に開示されたリニア状(線状)のセントロメアの酵母合成染色体(YAC)の少なくとも2MbのDNAを支持(サポート)するだろうということが知られており、そして、このことは、Kouprina, N., et al., EMBO Rep. (2003) 4:257-262によって開示されているように、大腸菌内で不安定な配列をクローン化することに使用されている。

20

【 0 0 0 8 】

更なる生物の核酸断片を組み換える能力もまた、研究されている。Holt, R. A., et al., Bioessays (2007) 29:580-590は、ラムダレッド組み換えシステム(lambda Red recombination system)を用いて、1830kbのインフルエンザ菌のゲノム(Haemophilus influenzae genome)を大腸菌細胞の中で組み立てることを提案している。Itaya, M., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (2005) 102:15971-15976、及び、Yonemura, I., et al., Gene (2007) 391:171-177は、バチルス・サブチリス(Bacillus subtilis)内で大型DNAのセグメントを組み立てる方法を開発している。これらのDNA分子は、宿主生物内で、サブフラグメントの段階的な追加の後に限り、1つずつの重複セグメントの追加によって、構築される。

30

【 0 0 0 9 】

完全なゲノムを製造するための、初期段階におけるインビトロの酵素的な組み換え、及び最終段階におけるインビボの酵母の組み換えの組合せを採用する全体の合成M.ゲニタリウムのゲノムの組み立ては、Gibson, D. G., et al., Science (2008) 319:1215-1220において、本願発明者らによって開示されている。

【 発明の概要 】

40

【 0 0 1 0 】

[発明の開示]

1つの視点において、本発明は、目的のヌクレオチド配列に基づくか、又は任意の所望のヌクレオチドを有する大型で、任意的に合成的でも良い(optional synthetic)核酸分子の組み立て方法に関する。該方法は、およそ50キロベース以上を含む任意の配列に簡単に適用することができる。

【 0 0 1 1 】

一般的には、所望の核酸配列が確認(ないし同定)され、所望の核酸配列用のビルディングブロックを設計(ないしデザイン)するためのテンプレートとして使用される。ターゲット分子は、自然に発生(存在)する配列を含むことができ、あるいは、実施者(prac

50

tioner) が設計しても良い。この配列の重複するセグメント (segments) を示すカセット (cassettes) は、全体的な所望の配列をカバーするように設計される。1つの好ましい実施形態では、いくつかのカセットは、確認 (同定) できるようにするための透かし配列 (watermark sequences) を含むように設計される。透かし配列は、ノンコーディング又は、コーディング配列のいずれかであり得る。典型的には、透かし配列は、最終的な所望の核酸配列に対する生物学的な影響を最小化するように、トランスポゾン挿入を許容 (tolerate transposon insertion) することが知られている部位 (sites) に配置される。一度設計されると、当該カセットは、個々のヌクレオチドを使用して新たに配列を合成することなどの標準的な技術を使用して合成されるか、又は、天然資源から得られる。

【0012】

10

本発明の方法の1つの実施形態において、典型的には2 - 10 kbの大きさ (ないしオーダー) のカセットは、例えば、前記PCT出願公開 (複数) に開示された技術に従って、インピトロで組み立てられ、所望のヌクレオチド配列のサブセット (部分集合: subsets) が得られる。所望の配列のより大きな部分を逐次的に (progressively) 組み立てるように、いくつかのインピトロステップを実行することができる。このようにして、およそ100 kbのオーダーの配列を含むサブセットが得られる。次に、これらの所望の配列のより大型のサブセットは、宿主細胞に導入され、そこで、再結合ないし組み換えられ (recombined)、そして組み立てられる (assembled)。このステップも、所望の大型の核酸分子が完成するまで、必要であれば繰り返される。

【0013】

20

合成の核酸カセット及びサブセットは、プラスミド、メガプラスミド、或いは、植物合成染色体、微生物合成染色体、哺乳類合成染色体、酵母合成染色体、サテライト (satellite) 合成染色体、ソーセージ (sausage) 染色体、ギガ染色体、及びメガ染色体などの合成染色体の形態で製造することができる。原核生物又は真核生物の宿主細胞 (大腸菌のような微生物宿主細胞、出芽酵母などの酵母宿主細胞、そしてヨトウガ (Spodoptera frugiperda) などの昆虫宿主細胞を含むがこれらに限定されない) は、両方とも記載の方法で使用する事が考慮される。

【0014】

従って、1つの視点において、本発明は、

所望の核酸分子の合成方法であって、

30

下記のステップa) ~ c) :

a) 複数のカセットを提供するステップ、<但し、ステップa)において、該カセットの各々は、所望の核酸の一部のヌクレオチド配列を含み、該カセットは、所望の核酸分子のヌクレオチド配列の重複部分 (複数) を含み、そして、該カセットは、該重複部分 (複数) に従って結合 (コンバイン: combine) した場合には、所望の核酸の完全なヌクレオチド配列を提供すること>、

b) インピトロで前記カセットを結合して、結果として形成される複数のサブセットを得るステップ、<但し、ステップb)において、前記サブセットは、所望の配列の重複部分 (複数) を含み、そして、該サブセットは、重複部分 (複数) に従って組み立てた場合には、所望の核酸のヌクレオチド配列を提供すること>、

40

c) インピボで該サブセット (複数) を組み立て (assemble) て、所望の核酸分子を得るステップ、<但し、ステップc)において、前記組み立て物は、複製起点を更に含むこと>、

を含む方法に向けられる。

【0015】

上記のように、ステップb)及び/又はc)を、オリジナルのカセットのサイズ及び所望の核酸分子の長さに依存して、繰り返すことができる。ステップc)の組み立て物は、複製起点を示す追加の核酸配列を含むべきであり、また、セントロメア及び/又は選択可能なマーカーを含むことができる。これらは、別個のベクター (単数又は複数) に存在することができるか、又は、インピボの組み換えにおいて採用される1つ以上のサブセットに

50

含むことができる。

【0016】

少なくともいくつかのカセットは、組み立てられたサブセット又は所望の核酸の中のカセットを確認（同定）するための役割を果たす外来（foreign）DNAである「透かし配列」も含むことができる。

【0017】

他の実施形態では、非常に大きい核酸分子を多数のカセットからインピボで組み立てることができるように、酵母又は他の宿主細胞が重複配列で多数の核酸の断片を組み立てることが可能であることの実証の利点を得られる。従って、他の視点において、本発明は、

宿主細胞において、重複配列を有する少なくとも10個の核酸断片を同時に組み立てる方法であって、下記のステップを含む方法に向けられる：

前記細胞の培養物（ないしは、培養液）を前記複数断片の混合物で形質転換するステップ、＜但し、複製起点をコードするDNA、そして、好ましくはセントロメア、が前記複数断片の中（among）に含まれること＞、及び

組み立てた複数断片を形質移入した前記宿主又は他の複製細胞を培養するステップ。

【0018】

1つの実施形態では、選択可能なマーカーが、さらに、複数断片の中（among）に含まれる。

【0019】

この実施形態の1つのバリエーションにおいて、2つの前記断片は、それらの1つの末端において、エキソヌクレアーゼ活性に対する保護のためのテロメア配列（telomeric sequence）を含む。この実施形態の更なる他のバリエーションにおいて、異なる宿主において作動可能な複製起点を前記複数断片の中を含む。これらのバリエーションは、上記のインピトロ／インピボのステップの組み合わせを採用する方法のインピボのステップ（単数又は複数）にも適用することができる。

【0020】

インピボ組み換え（recombination）の視点では、断片は、二本鎖又は一本鎖のいずれであっても良い。二本鎖の断片は、一般的には、 $100 - 5 \times 10^6$ 塩基対であり、一本鎖の断片は、一般的には、より短い、 $40 - 1000$ ヌクレオチドの範囲にわたることができる。断片のサイズの広い範囲は、すべての中間の整数値（intermediate integral value）を含むものとする。もちろん、すべての断片が同一のサイズである必要はなく、サイズが同じ桁（order）の大きさである必要すらない。

【0021】

従って、この視点において、本発明は、

10個以上のDNA断片をターゲットDNA分子に組み立てる方法であって、下記のステップ（a）～（c）を含む方法に向けられる：

（a） 宿主細胞の培養物を十分な数の前記10個の断片（fragments）の各々のコピーを含む混合物で形質転換して、前記培養物の平均の細胞によって異なる断片の数の少なくともおよそ2倍に達する量のコピーを取り込ませるステップ、

＜但し、ステップa）において、前記断片は少なくとも10塩基対の重複配列を含み、該重複配列は、配列が重複して所望の順番の組み立て物を提供するように整列し、そして、複製起点が、前記断片の中に含まれること＞、

（b） 前記酵母培養物における前記断片の組み立てのために十分な時間を許容するステップ、さらに、

（c） 以下のいずれかのステップ：

（i）前記宿主を培養して、回収のための組み立てた核酸分子の十分なコピーを得るステップ、又は

（ii）前記宿主からDNAを抽出し、他の培養物に形質移入して、前記他の培養物が前記回収のための組み立てた核酸分子の十分なコピーを複製するようにするステップ。

10

20

30

40

50

【 0 0 2 2 】

選択肢 (i) を採用する場合には、複製起点は、宿主細胞において作動可能な複製起点である。選択肢 (ii) を実行する場合には、複製起点は、他の培養物と適合可能でなければならない。セントロメアを欠くことの意義は、単純に、複数の娘細胞に分配されるというよりもむしろ複製した DNA が単一の細胞に蓄積することであるので、選択肢 (i) を実行する場合には、セントロメアの包含は任意的 (optional) である。複数の娘細胞への複製した DNA 分子の分配を保証することは、必ずしも必要ではない。更に選択可能なマーカーを含むことができる。

【 0 0 2 3 】

複製起点 (及び / 又は 2 つの任意的な要素 セントロメア及び選択可能なマーカー) をコードする DNA は、別個の断片、又は組み立てられる 1 つ以上の断片の部分として、供給される。さらに、以下で説明するように、複製起点として作動 (ないし作用) 可能 (operable) な DNA 配列は、組み立てることが意図される断片において、本来的に発見することができ、別途に供給することは必ずしも必要ではない。

【 0 0 2 4 】

DNA 分子を、環状の組み立て物に組み込むことができ、かくして、エキソヌクレアーゼ活性から保存することができるか、あるいは、組み立てた断片の 2 つが、テロメア (複数) によって囲まれたリニアな組み立て物となるように、各々の 1 つの末端においてテロメアを含んでも良い。

【 0 0 2 5 】

いくつかの実施形態において、選択可能なマーカーを、断片 (複数) の中に含み、培養を選択条件下において実行して、本発明の方法がオリジナルの培養物又は他の培養物のいずれかから組み立てた DNA を回収することをさらに含むようにしても良い。組み立てた断片は、培養物から、又は個別の細胞より生育したコロニーから回収することができる。本発明の方法に従えば、少なくとも 1 つのターゲット DNA 分子は、10 個以上の断片から組み立てなければならないが、DNA 分子の複数 (multiple) の組み立てを、同一の細胞の中で、同時に行うことができる。

【 0 0 2 6 】

ここで記載した全ての特徴は、上記のインビトロ / インビボ合成の組み合わせの中の最終のインビボのステップにも採用される。

【 0 0 2 7 】

他の視点 (複数) では、本発明は、本発明の方法によって合成され、かつ、自然には発生しない合成大型 (large) 核酸分子に向けられる。一般的には、インビボ組み換えステップ (recombination steps) が、宿主細胞において作動可能な複製起点の包含を少なくとも必要とするので、該方法の結果物は新規である。本発明は、また、本発明の方法によって合成した合成大型核酸分子を含む細胞の培養物及びそのような培養物を使用する方法にも向けられる。

[請求項1001]

下記のステップを含む所望の核酸分子の合成方法であって、

a) 複数のカセットを提供するステップ、但し、ステップ a) において、該カセットの各々は、所望の核酸の一部のヌクレオチド配列を含み、該カセットは、所望の核酸分子のヌクレオチド配列の重複部分 (複数) を含み、そして、該カセットは、該重複部分 (複数) に従って結合 (コンバイン : combine) した場合には、所望の核酸の完全なヌクレオチド配列を提供すること、

b) インビトロで前記カセットを結合して、結果として形成される複数のサブセットを得るステップ、但し、ステップ b) において、前記サブセットは、所望の配列の重複部分 (複数) を含み、そして、該サブセットは、重複部分 (複数) に従って組み立てた場合には、所望の核酸のヌクレオチド配列を提供すること、

c) インビボで宿主培養物において該サブセット (複数) を組み立て (assemble) て、所望の核酸分子を得るステップ、但し、ステップ c) において、前記組み立て物は、複製

10

20

30

40

50

起点を更に含むこと、
を特徴とする方法。

[請求項1002]

前記重複部分（複数）は、少なくとも20ベースをそれぞれ含むことを特徴とする請求項1001に記載の方法。

[請求項1003]

ステップb)及び/又はステップc)を、少なくとも1回繰り返すことを特徴とする請求項1001に記載の方法。

[請求項1004]

ステップc)を酵母において実行し、前記複製起点は、酵母において作動可能（operable）であることを特徴とする請求項1001に記載の方法。

10

[請求項1005]

ステップc)の前記組み立て物は、セントロメア及び/又は選択可能マーカを含むことを特徴とする請求項1004に記載の方法。

[請求項1006]

前記複製起点を、追加のベクターに含むことを特徴とする請求項1001に記載の方法。

[請求項1007]

前記セントロメア及び/又は選択可能マーカを、追加のベクターに含むことを特徴とする請求項1005に記載の方法。

[請求項1008]

20

ステップa)の1以上のカセットが、透かし配列（watermark）を含むことを特徴とする請求項1001に記載の方法。

[請求項1009]

10個以上のDNA断片を単一のDNA分子に組み立てる方法であって、

下記のステップ：

（a） 宿主細胞の培養物を十分な数の前記10個の断片（fragments）の各々のコピーを含む混合物で形質転換して、前記培養物の平均の細胞によって異なる断片の数の少なくともおよそ2倍に達する量のコピーを取り込ませるステップ、

但し、ステップa)において、前記断片は少なくとも10塩基対の重複配列を含み、該重複配列は、配列が重複して所望の順番の組み立て物を提供するように整列し、そして、複製起点を、前記断片の中に含むこと、

30

（b） 前記酵母培養物における前記断片の組み立てのために十分な時間を許容するステップ、さらに、

（c） 以下のいずれかのステップ：

（i）前記宿主を培養して、回収のための組み立てた核酸分子の十分なコピーを得るステップ、又は

（ii）前記宿主からDNAを抽出し、他の培養物に形質移入して、前記他の培養物が前記回収のための組み立てた核酸分子の十分なコピーを複製するようにするステップ、を含むことを特徴とする方法。

[請求項1010]

40

組み立てたDNA分子を、宿主培養物又は他の培養物から単離するステップをさらに含むことを特徴とする請求項1009に記載の方法。

[請求項1011]

少なくとも2つのターゲットDNA分子を前記宿主培養物において組み立てることを特徴とする請求項1009に記載の方法。

[請求項1012]

複製起点が宿主において作動可能（operable）であり、宿主において作動可能なセントロメアを前記複数断片の中に含むことを特徴とする請求項1009に記載の方法。

[請求項1013]

他のシステムにおいて作動可能な複製起点を前記複数断片の中（among）に含むことを

50

特徴とする請求項1009に記載の方法。

[請求項1014]

選択可能なマーカーを前記複数断片の中に含み、前記培養を選択条件下で実行することを特徴とする請求項1009に記載の方法。

[請求項1015]

断片（複数）が二重鎖であり、 $100 - 5 \times 10^6$ 塩基対を含むことを特徴とする請求項1009に記載の方法。

[請求項1016]

断片（複数）が一重鎖であり、40 - 1000ヌクレオチドを含むことを特徴とする請求項1009に記載の方法。

[請求項1017]

前記断片の2つが、各々、1つの末端にテロメアを含むことを特徴とする請求項1009に記載の方法。

[請求項1018]

組み立てたDNA分子が自然に発生するゲノムを表すことを特徴とする請求項1009に記載の方法。

[請求項1019]

組み立てたDNA分子が所望の代謝経路を含むことを特徴とする請求項1009に記載の方法。

[請求項1020]

宿主培養物が酵母であることを特徴とする請求項1009～1019のいずれか1項に記載の方法。

[請求項1021]

請求項1001～1019のいずれか1項に記載の方法によって組み立てた単離状態のDNA分子。

[請求項1022]

請求項1001～1019のいずれか1項に記載の方法に従って組み立てたDNA分子を含む宿主培養物又は他の培養物。

[請求項1023]

酵母であることを特徴とする請求項1022に記載の宿主培養物、及び大腸菌又はバチルス

[請求項1024]

遺伝子の決定的性質（criticality）を評価する方法であって、

細胞培養物に形質移入した請求項1021に記載の合成核酸分子から候補遺伝子を削除する又は破壊すること、及び前記削除すること又は破壊することの培養物の生存に対する影響を評価すること

を含む方法。

【図面の簡単な説明】

【0028】

【図1】図1は、コンピューターシミュレーションに従った、25個のDNA断片のセット全体が取り込まれる（成功の）確率に対する、個々の細胞によって取り込まれたDNA断片の数のプロットを示す。

【0029】

【図2】図2は、582,970bpのM.ゲニタリウムJCVI-1.0合成ゲノムの図である。

【0030】

【図3】図3は、M.ゲニタリウム染色体の5段階の組み立ての手法（strategy）を示す。

【0031】

【図4】図4A - 4Cは、インビトロ組み換えによる、カセットの組み立てを示す。

10

20

30

40

50

【 0 0 3 2 】

【図 5】図 5 A - 5 D は、A - 、B - 、及び C - シリーズの組み立て反応、及びそれらのクローン化された産物の、選択された例のゲル電気泳動解析を示す。

【 0 0 3 3 】

【図 6】図 6 は、相同性ではない 3' 及び 5' の N o t I 配列を含むアニールした連結部の修復を示す図である。3' - G C ヌクレオチドは、チューバック反応の間に除去される。修復反応において、5' G G C C G C の N o t I 突出部分 (overhang) は、T a q ポリメラーゼに含まれる 5' エキソヌクレアーゼ活性によって除去される。

【 0 0 3 4 】

【図 7】図 7 A - 7 C は、酵母 T A R クローニング及びクローンの特徴 (付け) を示す。

10

【 0 0 3 5 】

【図 8】図 8 は、完全な組み立て物の酵母 T A R クローンのサイズの特徴 (付け) を示す。

【 0 0 3 6 】

【図 9】図 9 は、酵母における合成 M . ゲニタリウムゲノムの構築物の図である。

【 0 0 3 7 】

【図 10】図 10 A - 10 D は、25 個の DNA のセグメントで形質転換した酵母細胞をスクリーニングする多重 (multiplex) P C R 分析を示す。

【 0 0 3 8 】

【図 11】図 11 A - 11 C は、制限分析による、完全に無傷な M . ゲニタリウムゲノムの確認結果を示す。

20

【 0 0 3 9 】

【図 12】図 12 A - B は、図 11 で調査したクローン 1 の更なる解析を示す。

【発明を実施するための形態】

【 0 0 4 0 】

本発明の方法は、単純なインビトロの構築が適用できない十分に大きな核酸分子の容易な構築に適する。現在、およそ 300 kb よりも大きい核酸分子のインビトロの組み立ては、問題がある。しかしながら、より大型の断片は、重複する末端を有する配列を組み換えることと、2 - 10 Mb 以上の大型 DNA 分子を許容すること (tolerating) との両方が可能な適切な宿主細胞での再結合ないし組み換え (recombination) によって組み立て

30

【 0 0 4 1 】

従って、本発明の 1 つの応用は、生物から得られた遺伝情報に基づく合成ゲノム又はゲノム断片の構築に関する。全体 (whole) のゲノム由来の遺伝情報は、目的の合成配列を設計するための基盤 (ないし基礎) として使用することができる。例えば、哺乳類の全体的な染色体又はその断片の核酸配列は、人工的に生産する構築物のための鋳型であり得る。いくつかの生物からのゲノム配列は、公共的に入手可能であり、開示の方法と共に使用することができる。これらゲノム配列は、アエロピラム・ベルニクス (*Aeropyrum pernix*); アグロバクテリウム・ツメファシエンス (*Agrobacterium tumefaciens*); アナベナ (*Anabaena*); ガンビアハマダラカ (*Anopheles gambiae*); ミツバチ (*Apis mellifera*); アクイフェックス・エオリカス (*Aquifex aeolicus*); シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*); アーケオグロブス・フルギダス (*Archaeoglobus fulgidus*); アシュビア・ゴスピイ (*Ashbya gossypii*); 炭疽菌 (*Bacillus anthracis*); セレウス菌 (*Bacillus cereus*); バチルス・ハロデュランス (*Bacillus halodurans*); バチルス・リケニホルミス (*Bacillus licheniformis*); バチルス・サブチルス (*Bacillus subtilis*); バクテロイデス・フラジリス (*Bacteroides fragilis*); バクテロイデス・テタイオタオミクロン (*Bacteroides thetaiotaomicron*); ヘンセラ菌 (*Bartonella henselae*); 塹壕熱菌 (*Bartonella Quintana*); デロビブリオ・バクテリオボラス (*Bdellovibrio bacteriovorus*); ビフィドバクテリウム・ロンガム (*Bifidobacterium longum*); プロヒマニア・フロリダヌス (*Blochmannia floridanus*); ボルデテラ・ブロンキセプチカ (*Bordetella bronchiseptica*); パラ百日咳菌 (*Bordetella p*

40

50

arapertussis); 百日咳菌(*Bordetella pertussis*); ライム病ボレリア(*Borrelia burgdorferi*); ブラディリゾビウム・ジャポニクム(*Bradyrhizobium japonicum*); ヤギ流産菌(*Brucella melitensis*); ブタ流産菌(*Brucella suis*); ブフネラ・アフジコラ(*Buchnera aphidicola*); 鼻疽菌(*Burkholderia mallei*); 類鼻疽菌(*Burkholderia pseudomallei*); ブリグサ線虫(*Caenorhabditis briggsae*); エレガンス線虫(*Caenorhabditis elegans*); カンピロバクター・ジェジュニ(*Campylobacter jejuni*); カンジダ・グラブラタ(*Candida glabrata*); イヌ(*Canis familiaris*); カウロバクター・クレセンタス(*Caulobacter crescentus*); クラミジア・ムリダルム(*Chlamydia muridarum*); クラミジア・トラコマティス(*Chlamydia trachomatis*); クラミドフィラ・カビアエ(*Chlamydophila caviae*); クラミドフィラ・ニューモニエ(*Chlamydophila pneumoniae*); クロロビウム・テピヅム(*Chlorobium tepidum*); クロモバクテリウム・ビオラセウム(*Chromobacterium violaceum*); ユウレイボヤ(*Ciona intestinalis*); クロストリジウム・アセトブチリカム(*Clostridium acetobutylicum*); ウェルシュ菌(*Clostridium perfringens*); 破傷風菌(*Clostridium tetani*); ジフテリア菌(*Corynebacterium diphtheriae*); コリネバクテリウム・エフィシエンス(*Corynebacterium efficiens*); コクシエラ菌(*Coxiella burnetii*); クリプトスポリジウム・ホミニス(*Cryptosporidium hominis*); クリプトスポリジウム・パルバム(*Cryptosporidium parvum*); シアニディオシゾン・メローラエ(*Cyanidioschyzon merolae*); デバリオマイセス・ハンセニイ(*Debaryomyces hansenii*); デイノコッカス・ラジオデュランス(*Deinococcus radiodurans*); デスルホタレア・サイクロフィラ(*Desulfotalea psychrophila*); デスルホビブリオ・ブルガリス(*Desulfovibrio vulgaris*); キイロショウジョウバエ(*Drosophila melanogaster*); エンセファリトゾーン・クニクリ(*Encephalitozoon cuniculi*); フェカリス菌(*Enterococcus faecalis*); 軟腐病菌(*Erwinia carotovora*); 大腸菌(*Escherichia coli*); フフソバクテリウム・ヌクレアタム(*Fusobacterium nucleatum*); ニワトリ(*Gallus gallus*); ジオバクター・スルフレデュセンス(*Geobacter sulfurreducens*); グロエオバクター・ビオラセウス(*Gloeobacter violaceus*); ギラルディア・テータ(*Gillardia theta*); 軟性下痢菌(*Haemophilus ducreyi*); インフルエンザ菌(*Haemophilus influenzae*); ハロバクテリウム(*Halobacterium*); ヘリコバクター・ヘパティカス(*Helicobacter hepaticus*); ピロリ菌(*Helicobacter pylori*); ヒト(*Homo sapiens*); クリベロミセス・ワルティー(*Kluyveromyces waltii*); ラクトバチルス・ジョンソニー(*Lactobacillus johnsonii*); ラクトバチルス・プランタルム(*Lactobacillus plantarum*); レジオネラ・ニューモフィラ(*Legionella pneumophila*); レイフソニア・キシリー(*Leifsonia xyli*); ラクトコッカス・ラクティス(*Lactococcus lactis*); レプトスピラ・インターロガン(*Leptospira interrogans*); リステリア・イノクア(*Listeria innocua*); リステリア菌(*Listeria monocytogenes*); イネいもち病菌(*Magnaporthe grisea*); マンヘミア・サクシニシプロデューセンス(*Mannheimia succiniciproducens*); メソプラズマ・フローラム(*Mesoplasma florum*); メソリゾビウム・ロチ(*Mesorhizobium loti*); メタノバクテリウム・サーモオートトロフィカ(*Methanobacterium thermoautotrophicum*); メタノコッコイデス・ブルトニイ(*Methanococcoides burtonii*); メタノコッカス・ジャナシイ(*Methanococcus jannaschii*); メタノコッカス・マリパルデイス(*Methanococcus maripaludis*); メタノゲニウム・フリギダム(*Methanogenium frigidum*); メタノピルス・カンドレリ(*Methanopyrus kandleri*); メタノサルシナ・アセチボランス(*Methanosarcina acetivorans*); メタノサルシナ・マゼイ(*Methanosarcina mazei*); メチロコッカス・カプスラタス(*Methylococcus capsulatus*); マウス(*Mus musculus*); マイコバクテリウム・ボビス(*Mycobacterium bovis*); らい菌(*Mycobacterium leprae*); ヨーネ菌(*Mycobacterium paratuberculosis*); 結核菌(*Mycobacterium tuberculosis*); マイコプラズマ・ガリセプチカム(*Mycoplasma gallisepticum*); マイコプラズマ・ゲニタリウム(*Mycoplasma genitalium*); マイコプラズマ・ミコイデス(*Mycoplasma mycoides*); マイコプラズマ・ペネトランス(*Mycoplasma penetrans*); マイコプラズマ・ニューモニエ(*Mycoplasma pneumoniae*); マイコプラズマ・プルモニス(*Mycoplasma pulmonis*); マイコプラズマ・モービレ(*Mycoplasma mobile*); ナノ古細菌(*Nanoarchaeum equitans*); ネイッセリア・メニンギチデイス(*Neisseria meningitidis*)

ides); アカパンカビ (*Neurospora crassa*); ニトロソモナス・ユーロピア (*Nitrosomonas europaea*); ノカルジア・ファルシニカ (*Nocardia farcinica*); オセアノバシラス・イヘエンシス (*Oceanobacillus iheyensis*); タマネギ萎黄病菌 (*Onions yellows phytoplasma*); イネ (*Oryza sativa*); チンパンジー (*Pan troglodytes*); パスツレラ・マルチダ (*Pasteurella multocida*); 白色腐朽菌 (*Phanerochaete chrysosporium*); フォトラバダス・ルミネセンス (*Photorhabdus luminescens*); ピクロフィラス・トリダス (*Picrophilus torridus*); 熱帯熱マラリア原虫 (*Plasmodium falciparum*); プラスモディウム・ヨエリ (*Plasmodium yoelii yoelii* [sic, *Plasmodium yoelii*]); ポプルス・トリコカルパ (*Populus trichocarpa*); ジンジバリス菌 (*Porphyromonas gingivalis*); プロクロコッカス・マリナス (*Prochlorococcus marinus*); アクネ菌 (*Propionibacterium acnes*); プロトクラミジア・アモエボフィリア (*Protochlamydia amoebophila*); 緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*); プチダ菌 (*Pseudomonas putida*); シリング菌 (*Pseudomonas syringae*); ピロバクルム・アエロフィルム (*Pyrobaculum aerophilum*); パイロコッカ・アビシ (*Pyrococcus abyssi*); パイロコッカ・フリオサス (*Pyrococcus furiosus*); パイロコッカ・ホリコシイ (*Pyrococcus horikoshii*); ピロロブス・フマリイ (*Pyrolobus fumarii*); 青枯病菌 (*Ralstonia solanacearum*); ラット (*Rattus norvegicus*); ロドピレルーラ・バルティカ (*Rhodopirellula baltica*); ロドシュードモナス・パルストリス (*Rhodopseudomonas palustris*); リケッチア・コノリイ (*Rickettsia conorii*); リケッチア・チフィ (*Rickettsia typhi*); 発疹チフスリケッチア (*Rickettsia prowazekii*); リケッチア・シビリカ (*Rickettsia sibirica*); 出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*); サッカロポリスボラ・エリスラエア (*Saccharopolyspora erythraea*); サルモネラ菌 (*Salmonella enterica*); ネズミチフス菌 (*Salmonella typhimurium*); 分裂酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*); シェワネラ・オネイデンシス (*Shewanella oneidensis*); シゲラ・フレックスネリ (*Shigella flexneria* [sic, *Shigella flexneri*]); アルファルファ根粒菌 (*Sinorhizobium meliloti*); 黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*); 表皮ブドウ球菌 (*Staphylococcus epidermidis*); ストレプトコッカス・アガラクチア (*Streptococcus agalactiae*); ミュータンス菌 (*Streptococcus mutans*); 肺炎球菌 (*Streptococcus pneumoniae*); 化膿性連鎖球菌 (*Streptococcus pyogenes*); ストレプトコッカス・サーモフィルス (*Streptococcus thermophilus*); ストレプトマイセス・アヴェルミチリス (*Streptomyces avermitilis*); ストレプトマイセス・セリカラー (*Streptomyces coelicolor*); スルホロブス・ソルファタリカス (*Sulfolobus solfataricus*); スルホロブス・トコダイイ (*Sulfolobus tokodaii*); シネココッカス (*Synechococcus*); シネコシステイス (*Synechocystis*); タキフグ・ルブリペス (*Takifugu rubripes*); テトラオドン・ニグロビリディス (*Tetraodon nigroviridis*); タラシオシラ-シュードナナ (*Thalassiosira pseudonana*); サーマアナエロバクター・テンコンジェンシス (*Thermooanaerobacter tengcongensis*); サーマプラズマ・アシドフィルム (*Thermoplasma acidophilum*); サーマプラズマ・ボルカニウム (*Thermoplasma volcanium*); サーマシネココッカス・エロンガタス (*Thermosynechococcus elongates*); サーマトガ・マリティマ (*Thermotoga maritima*); サーマス・サーモフィラス (*Thermus thermophilus*); トレボネーマ・デントイコラ (*Treponema denticola*); 梅毒トレボネーマ (*Treponema pallidum*); トロフェリマ・ウィッペリ (*Tropheryma whipplei*); ウレアプラズマ・ウレアリチカム (*Ureaplasma urealyticum*); コレラ菌 (*Vibrio cholerae*); 腸炎ビブリオ (*Vibrio parahaemolyticus*); ビブリオ・バルニフィカス (*Vibrio vulnificus*); ウィグレスウォルチア・グロスインディア (*Wigglesworthia glossinidia*); ウォルバキア・ピピエンティス (*Wolbachia pipientis*); ウォリネラ・スクシノゲネス (*Wolinella succinogenes*); かいよう病菌 (*Xanthomonas axonopodis*); ザントモナス・カンペストリス (*Xanthomonas campestris*); ピアス病菌 (*Xylella fastidiosa*); ヤロウィア・リポリチカ (*Yarrowia lipolytica*); 仮性結核菌 (*Yersinia pseudotuberculosis*); 及びペスト菌 (*Yersinia pestis*) から得られる情報を含むが、それに限定されない。

【 0 0 4 2 】

更に、本願に記載の方法は、とうもろこし及びコメのような高等植物、マウス、豚、牛

10

20

30

40

50

及びコンパニオンアニマルのような哺乳動物等の多細胞生物を特徴付けるものを含む現在公開されていない核酸配列が、利用可能になった場合に、同様に適用することが可能である。これらの多くは、現在では利用可能である。

【 0 0 4 3 】

本発明の方法の以下の実施例及び考察を読めば、これらの適応性は、天然に存在するものを模倣する合成ゲノムを構築することに限られないことは明白である。より大型のDNA分子の構築に有用な最初のカセットは、実施者が所望する任意の仕方を選択することができる。従って、種々の生物のゲノムの一部 (portions) を、同一のDNA分子に含むことができるか、又は、任意のデザインのカセットを採用することができる。オリジナルのカセットは、自然に発生 (存在) するDNAから、又は、RNAの逆転写によって、合成

10

【 0 0 4 4 】

この方法に従って、単純に個々の代謝経路のメンバーを組み立てること、又は、複数の代謝経路を組み立てることも望ましい。天然に存在しない代謝経路をこのようにして構築することができる。従って、1つの生物に存在し、下流の酵素を欠く異なる生物によって製造される所望の基質に作用する酵素は、両方の酵素をコードする組み立て物を構築するお陰で同一の生物にコードすることができる。従って、複数の酵素を含んで、複雑な代謝経路を構築することができる。更に、組み合わせライブラリーは、断片 (ここで、1つ以上の断片は、同一の重複配列 (overlapping sequences) を有するが、酵素又は他のタンパク質をコードする異なる介在配列を有する) を混合することによって調製することができる。

20

【 0 0 4 5 】

遺伝経路は、組み合わせライブラリーの各メンバーが遺伝子変異体の異なる組み合わせを有するような組み合わせ様式で構築することができる。例えば、5つの断片から組み立てられ、そして、5個の各々の断片が6つの変異体を有する6⁵個の変異体の組み合わせライブラリーは、30個の個々のDNAエレメントから構築することができる。

【 0 0 4 6 】

1つの実施形態において、本発明の方法は、2つの合成の段階を採用する。最初の段階において、比較的小さい (small) 核酸分子がインビトロライゼーション反応において組み立てられる。前記PCT出願公開 (複数) に開示の方法においては二重鎖DNAが使用されるが、しかしながら、これら及びその他の方法が一本鎖DNAを組み立てることに使用することができる。一本鎖又は二本鎖DNAについては、これらの方法に加えて、等温性の方法も使用できる。1つの形態において、二本鎖核酸の操作が可能な有効な反応組成物が使用される。それは、3つの酵素 - T5エキソヌクレアーゼ、進行性ポリメラーゼ (processive polymerase) 及びTaqリガーゼを採用する。このシステムの詳細は以下のとおりである：反応混合液は、T5エキソヌクレアーゼ、Phusion (登録商標) ポリメラーゼ、Taq DNAリガーゼ、ISOバッファー (Tris pH 7.5、MgCl₂、dNTP's、NAD、DTT、PEG 8000) などの適切なバッファーを含み、そして、組み立ては、1時間以内の時間で、等温条件下で起こる。この反応混合液を凍結し、オリゴマーの断片 (その二重鎖の形態を含む) に反応混合液を加え、そして50 で10 - 60分間インキュベートすることにより直接的に使用することができる。この組成物を使用する方法は、T5エキソヌクレアーゼが、二重鎖の1つの鎖をチューバック (chew back) して、重複配列を露出させるので、二本鎖核酸を採用する。次に、Phusion (登録商標) ポリメラーゼ及びDNAリガーゼは、重複鎖のアニーリングの後に、修復の作用を行う。ISOバッファーの組成の典型的な濃度は、100mM Tris-Cl、5% PEG 8,000、10mM MgCl₂、10 mM DTT、1 mM NAD、及び200 µM dNTP'sである。

30

40

【 0 0 4 7 】

第2段階において、所望の配列のより大型のサブセットが得られた場合には、インビボの組み換え技術が採用される。場合によって、特に、サブセットが比較的小さい場合には、原核生物の細胞を使用することができる。しかしながら、より大型なサブセットのライ

50

ゲーションのためには、真核生物のシステム、特に酵母が好ましい。インビボ組み換えの特徴は、以下に記載の完全なインビボのアセンブリを採用する他の実施形態に関連して詳細に検討する。

【0048】

複数のDNA断片（一般的に、10個以上のDNA断片）のインビボのアセンブリを、以下では、酵母を宿主培養物（液）として用いて例示する。しかしながら、デインコッカス・ラジオデュランス (*Deinococcus Radiodurans*) などの他の宿主で、酵母を置換することができる。組み換えを促進することができる他の生物が知られている。

【0049】

更に、相同性でない連結（non-homologous enjoining）を起こすことが知られる遺伝子を変異させること、又は削除することは、有利であり得る。出芽酵母においては、これらの遺伝子は、Ku及びDNAリガーゼIV、並びにRad50、Mre11、そしてXrs2を含む。このことは、望ましくない組み換えの背景（ないしバックグラウンド）を最小化するだろう。

【0050】

従って、酵母における、複数の断片の組み立ての実証は、説明のみのためである。本願で定義の場合に、「閉鎖」（close）培養物とは、組み立てのために、断片が形質移入された培養物である。そして、「他の」（alternate）培養物とは、更なる複製のために、組み立てられたDNAを移入することができる、他のタイプの生物又は細胞の培養物を意味する。

【0051】

酵母で説明したようなインビボの組み換えの使用は、単一の効果的な組み立てステップでの複数のDNA断片の組み立てのための強力なツールを提供するため、他の実施形態においては、インビトロのサブセットの組み立ての前もった実施は、採用されない。この実施形態は、複数の断片を吸収して組み換えて、この組み換えの結果生じる大型の組み立て物を許容して増殖する酵母又は他の宿主の能力の利点を利用する。インビボの組み立ては、10 - 500と同等数の断片の組み立てに適する。以下に説明するように、25個の断片の組み立てが成功したことが実証されている。記載した基本的な技術は、50、75、100、200、300、400又は500のそのような断片を組み立てることができる。組み立てられる断片は、二本鎖であって、100 - 5 × 10⁶塩基対、又は、200、500、1000、5000、10000、100000又は10⁶を含む任意の中間の数の塩基対を含むことができ、あるいは、一本鎖であって、40 - 1000個のヌクレオチド又は、100若しくは500のような中間の任意の整数値のヌクレオチドを含むことができる。組み立てられる[断片の]好ましい数は、その断片自身のサイズに依存し得る。上記の様に、全ての断片が、同一サイズである必要はなく、また、同じ桁の大きさである必要すらない。従って、単一の混合物中の断片（の寸法）は、その範囲にわたって変動することができる。非常に大型の組み立て物を許容することができる。

【0052】

任意のサイズの構築物は、サブフラグメントが核に入ることができる限り、酵母細胞内で組み立てることができ、そして構築されたDNAセグメント（segment）は、完全にかつ正確に複製され、宿主細胞への毒性を発生しない。

【0053】

酵母内で組み立てられた分子のDNA複製は、高度に保存され、必須のAエレメント又は自己複製配列(ARS)の共通配列(5'-T_ATTTA_A^T_C^ATTT_A^T-3')に依存する(Bell, S. P., Curr. Opin. Genet. Dev. (1995) 6:1634-1637参照)。統計的には、この配列は、全ての4つの塩基が等しく現れる場合、組み立てられた構築物の内で、~262 kbに1回存在するべきである。上記のように、これら複製起点は、組み立てが望まれる断片に自動的に存在することができるため、特定の複製起点の計画（意図）的な供給を必ずしも必要でなくすることができる。以下の実施例4の説明において、これらエレメントは、ゲノム自体が高いA + Tの組成を有するM.ゲニタリウムのゲノムを表す断片において、より頻繁に存在す

10

20

30

40

50

るべきである(平均で26.9回、あるいは~16kbに1回)。これは、ベクターから2つを含むゲノムを組み立てたARS共通配列の20個の事例があることとして確認されている。これは、有効な複製起点を欠く170kbのYACが、酵母において細胞周期チェックポイント(checkpoint)の応答を引き起こすことができることが示されているので、重要な考察(事項)である(van Brabant, A. J., et al., Mol. Cell (2001) 7:705-713)。

【0054】

従って、5Mbと同程度から20Mbまでの組み立て物を、酵母において組み立てることができ、そして本発明の方法のインピボの視点は、本発明の方法を使用して、6-1000、又は中間の数の独立のDNA断片を組み立てて、20Mbくらいの長さの配列を組み立てる機会を提供する。

10

【0055】

宿主に関わらず、組み立てを生じさせるためには、組み立てられるべき断片は、それらの末端で重複する配列を含まなければならない。1つの実施形態においては、重複は約10bpであり、他の実施形態においては、重複は15、25、50、60又は80bpそして、この範囲内の全ての整数の[塩基対]であり得る。全ての断片の重複の長さは、全て同じである必要はない。しかしながら、誤った組み立てを回避するために、個々の重複(部分)は、断片間で重複するべきではない。

【0056】

インピボの組み立ての方法において、組み立てられる全ての断片の混合物は、標準の形質転換技術を使用して、宿主である組み換え及び組み立て細胞に形質移入することに使用される。混合物中の断片分子数の、形質転換される培養物中の細胞の数に対する比率は、少なくともいくつかの細胞が、混合物中に存在する異なる断片よりも、多くの断片の分子を取り込むことができるように、十分に高くなければならない。以下の実施例においてこのことが説明される。すなわち、以下の実施例では、25個の異なる断片を含む混合物に関し、平均の細胞が少なくとも40個の断片を吸収するのに十分な断片分子が混合物中に存在することが見積もられており、この説明において、およそ1000個に1個の細胞が、25個の異なった断片の各々を含む。しかしながら、平均的細胞が少なくとも100個の断片を取り込むように取り込みのレベルを増強させることによって、十分に高い割合の細胞が、25個の異なった断片全てを含有するだろう。平均的細胞によって取り込まれる数が大きければ大きいほど、各異なった断片を代表する1つが、その取り込まれるものに含まれる可能性が大きくなる。

20

30

【0057】

従って、10個の断片の組み立てのためには、混合物が十分な数の断片分子を含み、15-20個の断片を含む平均的細胞を提供することが望ましく、同様に、100個の異なる断片がある場合には、1つの実施形態において、平均細胞が150-200の断片を取り込むために十分な濃度の混合物が供給されることが望ましい。

【0058】

実施可能な方法を提供するために、組み立てられる断片は、複製起点を提供するDNAを含まなければならない、任意であり好ましくはセントロメア、そして、任意であり好ましくは選択可能なマーカーを含むべきである。複製起点は、複製を実行することを意図した最初の又は他のタイプの細胞においてのみ作動可能(operable)であってよく、あるいは、シャトルベクターは、例えば、最初の宿主における複製、そして、次に、大腸菌又はバチルスなどの他の宿主への形質移入の両方ができるようにするために使用することができる。単一の断片の1つに、これらエレメントの2つ、又は3つの全てを含むことは、都合がよいが、必ずしも必要ではない。これらのエレメントが存在する場合には、組み立てられた配列を複製することができた細胞のみが回収される。テロメアによって保護されていないリニア状のDNAは消化を受けるため、組み立てられた環状のDNA又は、テロメアで保護した組み立てDNAのみが生存し、複製する。

40

【0059】

複製起点は、実施者により選択された一つであり得、組み立てが望まれる断片の一つに

50

含むこと、あるいは、組み立てに含まれる別のベクター断片上に含むことができる。しかしながら、断片の性質次第では、断片自身に常在する複製起点として作動（機能）することができる配列が同時に存在することに起因して、追加の複製起点が必要でない場合もある。実際には、むしろ、そのような配列が実際に生ずる高い可能性がある。

【0060】

セントロメアの存在は、複製されたDNAが、複製中に母細胞と娘細胞の間で分配されることを単に保証するに過ぎない。いくつかの実施形態では、組み立てられたDNAの複数のコピーが、同じ細胞に残り、さらに効率的に回収されるようにすることができる。従って、セントロメアの存在は好ましいが、それが必要不可欠であるということではない。同様に、選択可能なマーカーの存在は任意的（optional）であるが、DNAを環状パターンに組み立てた、あるいは、DNAがテロメアで保護された細胞において、成功した変異体の回収を容易にする。

10

【0061】

いくつかの実施例では、環状DNAは、上記のように形成される。しかしながら、他の実施形態では、酵母ゲノム自身の消化から保護されたりニア状の分子を組み立てるように、酵母ゲノム自身を模倣して、2つの断片にテロメアを供給することができる。そして、選択可能なマーカーは、成功したコロニーの同定を容易にする。

【0062】

いくつかの実施形態では、単一の宿主細胞において断片から単一のターゲットDNA分子のみを形成するというよりはむしろ、複数の断片組み立て物が得られる。従って、例えば、2つの別々の産物（一方は10個の断片から組み立てられ、他方が5個の断片から組み立てられた産物、あるいは、一方は20個の断片から組み立てられ、もう一つは50個の断片から組み立てられた産物）が、一つの宿主細胞において形成され得る。

20

【0063】

1つの実施形態では、成功裏に組み立てられた環状の又はテロメア - 保護されたDNA配列を有する細胞は、宿主内で増殖し、そして、宿主培養物、あるいは、個々の宿主細胞コロニー（colonies）から得られた培養物（複数）から単離される。他の一実施形態では、宿主培養物を断片の混合物と共に短時間（およそ15分から2時間）処理し、次に、全てのDNAを抽出し、大腸菌又はバチルスなどの他の細胞種に形質移入する。この実施形態では、他の細胞種に適切な複製起点を含むベクターが利用される。いくつかのケースにおいて、この実施形態は、これらの他の細胞の複製時間の短縮に起因して、十分な量の組み立てられたDNAの回収に必要な時間を短縮するという利点を有する。例えば、酵母では、分析のために十分な組み立て物の分子を得るためには2 - 3日間が必要であるが、これに対し、大腸菌の複製時間は、数時間のうちでそのような回収ができるようにする。

30

【0064】

成功裏の再組み立てを提供するためには、処理した培地に含まれるほんの少しの割合（percentage）の細胞が、十分な数の断片を取り込み、それらを組み換える必要がある。組み立てが生じていない細胞中のDNAは、複製されないから、[組み立てが]失敗した細胞は、培地内に現れないだろう。上述のように、所望であれば、いくつかの実施形態において、DNAが抽出される細胞を、所望の構築物を有する細胞に限定する、追加的で、おそらくは冗長的方法を提供するように選択可能なマーカーをも含むことができる。

40

【0065】

複数のDNAの断片の単一の環状の、又は、テロメア - 保護された分子（telomere-bracketed molecule）への組み立ては、任意の所望の組み立て物の構築のために使用することができる。以下に示すM.ゲニタリウムなどの天然に存在するゲノムは、この様式で組み立てることができ、そのため、合成的に調製することができる。

【0066】

大腸菌のゲノム又はインフルエンザ菌（*H. influenzae*）等の他のゲノムなどの他のゲノムはこの様式で組み立てることができるであろう。複数の断片を組み立てる宿主の能力のため、単純にゲノムを単離して、それを最初の宿主において複製することは可能である

50

だろうが、ゲノムを生物から完全な形（無傷：intact）で抽出する必要はない。分離された形態（disassembled forms）は、自動的に、再組み立てに必要とされる重複配列を含むだろう。

【 0 0 6 7 】

十分量の DNA 分子の組み立ての際に、それらを、宿主又は他の宿主細胞培養物から回収することができる。標準的な単離技術が採用され、これらの単離技術は本発明の分野において周知である。「単離された」とは、DNA がその自然環境の外に存在することを意味する。従って、この意味において、再組み立てが起こった培養物に含まれる再組み立てされた DNA でさえ、「単離された」と考えることができる。しかしながら、これらの細胞からの DNA の回収は、組み立てられた DNA の更なる操作のために、あるいは、動物、植物又は昆虫細胞を含む他の細胞内で培養するために望まれ得る。

10

【 0 0 6 8 】

酵母のような宿主細胞培養物を形質転換するために必要な断片の濃度の決定は、上記のように、実験的に（ないし経験的に）決定される。細胞が複数存在すること（multiplicity of cells）は、十分な数の細胞が適切な数の断片を取り込むことを保障するために必要とされ、この取り込みを生ずるように十分な断片を供給しなければならない。本願明細書における下記実施例 4 において達成されるような、25 個の断片の組み立て物（assembly）に関する説明的な決定は、次のように説明される。

【 0 0 6 9 】

この説明において、個々の宿主細胞は、25 個の断片の完全な組み立て物を構築するためには、25 個の DNA 断片の各々を、少なくとも 1 つずつ取り込まなければならない。細胞が無作為に正確に 25 個の断片を取り込む場合には、細胞が各々を 1 つずつ取り込む可能性は、 $25! / (25^{25}) = 1.7 \times 10^{-10}$ であり、非常にまれな出現率（occurrence）である。従って、平均の宿主細胞が実質的に 25 個を上回る断片を取り込むことが望まれる。宿主細胞が、無作為に、 $N > 25$ 個の等しく現れる断片を取り込む場合には、全ての 25 個の異なる断片を得る可能性はどれくらいだろうか？。「収集者の問題」のこのバージョンに関する解答は、全体的な範囲の可能性にわたって計算することが難しいが（Feller, W., An Introduction to Probability Theory and Its Applications (1950) Wiley, New York)、しかしながら、おおよその答えは、図 1（Y 軸は、成功の確率を示し、X 軸は、宿主細胞によって取り込まれるコピー数を示す）に示すように、コンピューターシミュレーションによって容易に得られる。このプロットを得るために、対象物（object）を引くごとに対象物を置き換えつつ、25 個の対象物（DNA の断片）のバッグからの N 回引き（draws）を行った。この試みは、全ての 25 個の対象物を少なくとも 1 回引いた場合に、成功とした。各 N について多数の試みを実行して、本当（true）の成功確率の良い近似値を得た。図 1 は、1 つの細胞が ~ 90 個の断片を取り込む場合には、25 個全ての異なる断片を取り込む可能性が 50 % あることを示す。平均の細胞が 40 個の断片しか取り込まない場合であっても、 10^8 個の宿主細胞を DNA に曝せば、およそ 1000 個に 1 つは、完全な断片のセットを得るだろう。

20

30

【 0 0 7 0 】

酵母及び他の組み立て宿主（assembly hosts）における DNA の取り込みと組み立ての効率は知られていない。組み換えが高い効率である場合には、母集団の中のわずかな細胞のみが、重複する断片の完全なセットを取り込むことが必要であろう。効率が低い場合には、比較的より多くの細胞が完全なセットを必要とするだろう。

40

【 0 0 7 1 】

本発明の方法を使用して任意の大型 DNA 分子を組み立てることができる。1 つの特に有用な応用は、微生物からのゲノムの組み立て（assembly）である。1 つの応用において、組み立てられるべき配列は、1 つの組織（ないし生物）の全体的なゲノム又はその分画のヌクレオチド配列を含むことができる。記載の方法によって組み立てられるヌクレオチド配列は、原生生物界、古細菌、真正細菌、真菌、植物（Platae [sic, Plantae]）あるいは動物などの、任意の生物から得ることができる。ウイルスゲノムからの配列情報も、記

50

載の方法で使用する事が考慮される。

【0072】

インビトロ/インビボ合成方法の組み合わせ、又は、全てインビボで組み換え合成する方法のいずれかに関して使用されるときには、「カセット」(cassette)は、単一のヌクレオチド(複数)から合成されたか、制限消化したゲノムDNAの分画によって生物自身のゲノムから取得されたか、あるいは生物のmRNAから逆転写されたcDNAから得られた所望のターゲット核酸分子の配列の一部を含む出発(starting)核酸分子を意味する。典型的には、最初の(initial)カセットは、およそ2 - 10 kbのオーダ及び全ての間値であり、好ましくは、およそ5 kbのオーダである。これらのカセットは、より小さいオリゴヌクレオチドの連結によっても、組み立てることができる。典型的には、このカセットは、二本鎖であるが、一本鎖のカセットも同様に使用することができる。用語「カセット」は、インビトロのライゲーションの方法から得られる出発カセットの更なる組み合わせも含む。所望の配列の最初の部分のインビトロライゲーションによって取得可能なカセットは、典型的には、およそ15 kbからおよそ200 kbまでの範囲及びその間の全ての間値にわたる。これら組み立て物は、「カセット」、又は「サブセット」のいずれかと称することができ、ここで、「サブセット」とは、所望のターゲット核酸分子の配列のサブセットを意味し、所望のターゲット核酸分子は、インビトロ/インビボの方法における、インビボの組み換えに使用する断片を意味する。

10

【0073】

「サブセット」は、インビトロ/インビボの方法における、インビボの組み換えに適する大きさのカセットの組み立て物を意味する。これらも一本鎖又は二本鎖であり得る。ターゲット核酸分子のサイズに依存して、そのようなサブセットは、典型的には、50 - 500 kbの範囲内及びこれらの両端値の間の整数値である。従って、この、本発明の方法の実施形態は、最初のカセットで開始し、その組み立て物を介して、次にインビボで組み立てられる「サブセット」(複数)に結果としてなる。インビトロにおいておよそ75 - 200 kbのサイズまでカセットを組み立てて、次に、インビボにおいてこのサイズのサブセットの組み立てをさらに実行することは、好都合であるが必要ではない。

20

【0074】

下記実施例1 - 3において記載のように、M.ゲニタリウムJCVI - 1.0の染色体全体は、M.ゲニタリウムG37に基づいて調製され、そして、TARBA Cクローニングベクターを使用して酵母で増殖された。この構築物は、既に報告されている合成DNA産物よりも大きい大きさの桁(オーダ)を上回る。この染色体を受容性のマイコプラズマの細胞質に導入して、生きた「合成の」細胞を生産することができる(Lartigue, C., et al., Science (2007) 317:632-638)。この合成染色体は、トランスポゾン挿入を許容する配列である遺伝子間において5つの短い透かし配列を含み、そして、これら挿入配列が生存能力に影響するとは予測されない。遺伝子MG408の中に、病原性を除く目的の挿入配列もあり、合成ゲノムは、移植実験における選択に使用することができるアミノグリコシド耐性遺伝子を保有する。特に、この挿入配列が生存可能なM.ゲニタリウム株に存在するので、生存能力に影響を与えることは予測されない。

30

【0075】

インビトロの手順の効率は、組み立て物がより大型になるときに低下する。これは、反応中に、環状の形態よりも優先的に形成され得るコンカテマーの形成が原因であり得る。更に、大型の微生物の合成染色体(BAC's)(>100 kb)は、より低い効率で形質転換される。Shengらは、同一の大腸菌のレシピエント株において、80 kbのBACよりも30倍も低い効率で240 kbのBACが形質転換されることを発見した(Sheng, Y., et al., Nucleic Acids Res. (1995) 23 : 1990-1996)。

40

【0076】

下記実施例2及び4では、インビボ酵母組み換えを使用した。実施例2において、各々が隣接する断片に対する末端の80 bpの相同配列(homologies)を有する重複断片を効率的に組み立てて、次に酵母における形質転換関連組み換え(transformation associated

50

recombination) (TAR) メカニズムによって、重複するベクターDNAに連結した。2つの1/4 (two quarters) のM. ゲニタリウムゲノムは、酵母ベクターにおいて、半分のゲノムとして効率的にクローン化することができ、そして、さらに驚くべきことに、4つの1/4のゲノムは、組み換えられて、1つの全体ゲノム (whole genome) としてクローン化された。

【0077】

合成染色体の構築及びマイコプラズマ種への移植が成功することは、合成ゲノムのアプローチを使用して最小の細胞を作製する試みの第1のステップである。カセットをベースとする組み立て手法 (strategy) は、最小の細胞の構築を容易にする。推定上の不必要 (dispensable) な遺伝子を、個々のカセットから削除することができる。次に、ネイティブなカセット及び削除されたカセットの混合物を、組み立てることができる。このアプローチは、完全にネイティブなゲノムから広範囲に削除されたゲノムにわたる個々のメンバーを有するライブラリーを作製するだろう。レシピエントたるマイコプラズマへのゲノムライブラリーの移植は、多くの新しい生存可能な変異体を産出するだろう。その際には、移植されたゲノムDNAのゲル電気泳動は、減少したゲノム、又は、おそらく最小であるゲノムとしての研究のために、最小のゲノムを選択することに使用することができる。

【0078】

M. ゲニタリウム JCVI - 1.0 は、終止コドン (UGA) のトリプトファンへの特定の使用を有する小さいゲノムである。M. ゲニタリウムの大部分のタンパク質は切断される (truncate) から、これは、大腸菌や他の生物におけるクローニングを低毒性にする。他の構築物がこのコードを使用する場合には、合成細胞を生産する移植は、適切にUGAをトリプトファンに翻訳することができる細胞質において実行する必要があるだろう。適切なコドンの使用を有する受容性の細胞質がある限り、他のコドン変化を使用することができるかもしれない。

【0079】

下記の実施例において、目的は、正確な設計した配列を有する582,970塩基対の長さのクローン化した合成ゲノムを生産することであった。いくつかの仕方で、実際の配列と設計した配列との間で、カセットを調製することに使用する配列におけるエラー、生産されたカセットにおけるエラー、及び組み立て接合部の修復の間に起こるエラーを含む差 (エラー) が起こり得るので、このことはささい (trivial) なことではない。大腸菌又は酵母における組み立て物の増殖もエラーに導き得る。後の2つの (エラーの) 例では、エラーは組み立ての後期の段階で生じ得るだろう。従って、組み立て中のいくつかの時点で、ゲノム組み立てクローンをシーケンスすることは、賢明である。下記の実施例において、上述の全てのタイプのエラーが発見されたが、エラーの数は小さく、それらは成功裏に訂正された。

【0080】

例えば、下記のC50 - C77の1/4分子のシーケンスの確認中に、2つの単一塩基対の欠損を検出した。1つは、カセット54における合成エラーであることが追跡された。カセット68におけるエラーは、間違った配列がこのカセットのシンセサイザー (synthesizer) へ伝達したので生じた。カセット54のエラーは、シンセサイザーによって訂正した。カセット68は、エラーを含む制限断片を新しく合成された断片で置き換えることによって訂正した。C50 - 77は、再組み立てを行って、シーケンスした。2つのエラーは訂正したが、2つの新しい単一塩基の置換エラーが出現した。連結部分におけるTaqポリメラーゼの取り込みミスは、これらのエラーの1つを起こしやすい。他の残りのものは未解明であるが、大腸菌における増殖中に生じたものであり得る。1つの最終的な再組み立ては、全体の染色体を組み立てることに使用したC50 - C77の正しい配列を産出した。

調製A

M. ゲニタリウムゲノム配列の確認

10

20

30

40

50

【 0 0 8 1 】

M. ゲニタリウム G 3 7 ゲノムは、1995年に最初にシーケンスされた。しかしながら、配列内のエラーが生産できない合成ゲノムになり得るので、ゲノムは単離され、再シーケンスされた。決定した配列は、オリジナル（最初）の配列と、34箇所が異なった。See Glass, J. I., et al., PNAS (USA) (2006) 103:425-430参照。この改定したシーケンスは、生存可能なM. ゲニタリウム G 3 7 ゲノムを正確に特定する。

【 0 0 8 2 】

以下の実施例は、説明のために提供されるが、この発明を限定せず、完全なM. ゲニタリウムゲノムの合成を詳細に記載する。実施例1-3で提供されるインビボ/インビトロ合成の組み合わせにおいて、合成の概要は以下のように概説することができる：

【 0 0 8 3 】

合成の582,970塩基のマイコプラズマ・ゲニタリウムJCVI1.0ゲノムは、病原性を遮断するために破壊したMG408を除いた、野生型のM. ゲニタリウムG37の全ての遺伝子を含む。このゲノムはまた、ゲノムの構成物としての同定のために、許容性トランスポゾン挿入配列として知られる遺伝子間の部位に位置する追加の「透かし」配列も含む。抗生物質耐性マーカーは、選別を可能にするために含まれる。化学的に合成されたオリゴヌクレオチドから組み立てられた5-7kbの重複する「カセット」を、インビトロで連結して、大腸菌において細菌性合成染色体(BAC)として全てクローン化した~24kb、~72kb(「1/8ゲノム」)、~144kb(「1/4ゲノム」)の中間の組み立て物を生産した。これらの中間のクローンの大部分をシーケンスし、そして正確な配列を含む1/4ゲノムの4つの全てのクローンを同定した。完全な合成ゲノムを、出芽酵母における組み換え関連形質転換(TAR)クローニングによって組み立てて、次に、単離し、シーケンスした。正確な配列を含むクローンを同定した。この合成M.ゲニタリウムゲノムも、単離できる。

【 0 0 8 4 】

図2は、合成ゲノムを示す。図2に示す特徴は、透かし配列、アミノグリコシド耐性マーカー、生存可能なTn4001トランスポゾン挿入配列の位置、全体ゲノム配列を含む重複する合成DNAカセットの位置、485個のM.ゲニタリウムタンパク質をコードする遺伝子の位置及び、43個のM.ゲニタリウムrRNA、tRNA、及び構造上の(structural)RNA遺伝子の位置、を含む。

【 0 0 8 5 】

図3は、全体的なプランを示す。最初の組み立て段階において、4個のカセットを連結し、およそ24kbの長さのA-シリーズの組み立て物を作製した。次の段階では、3個のA-組み立て物を一緒にして、合計8個のおよそ72kbのB-シリーズの組み立て物を作製した。1/8ゲノムであるB-組み立て物を一度に2つ採用して、1/4ゲノムであるC-シリーズの組み立て物を作製した。これらの組み立て物は、全てインビトロ組み換えによって作製し、BACベクターを使用して大腸菌にクローン化した。半分のゲノムと、全長(full)ゲノムの組み立て物は、インビボの酵母組み換えによって作製した。太いボックス内の組み立て物をシーケンスし、その正確性を確認した。

【 0 0 8 6 】

最初の段階では、4個の隣接するカセットのセット(sets)を下記のようなインビトロ組み換えによって組み立てて、BACベクターDNAに連結して、~24kbの挿入配列を有する環状化した組み換えプラスミドを形成した。例えば、カセット1からカセット4と一緒に連結してA1-4組み立て物を形成し、カセット5からカセット8を組み立ててA5-8を形成した。カセット40及び41を合併してラベルした単一のカセット41*を形成したため、101個のオリジナルなカセットは100個まで減少し、25個のA-シリーズの組み立て物(assemblies)が産出した。第2の段階において、25個のA-シリーズの組み立て物を、1度に3個採用して、B-シリーズの組み立て物を形成した。例えば、B1-12を、A1-4、A5-8及びA9-12から構築した。1つの例外は、5個のA-組み立て物から作製したB62-77である。このことは、25個のA-組み立

て物を、各々がサイズでおよそ 1 / 8 ゲノム (~ 7 2 k b) であるたった 8 個の B - 組み立て物まで減少させる。第 3 の段階において、1 / 8 ゲノムの B - 組み立て物を 1 度に 2 つ採用して、各々がサイズでおよそ 1 / 4 ゲノム (~ 1 4 4 k b) である 4 個の C - 組み立て物を作製した。これら最初の組み立ての 3 つの段階を、インビトロ組み換えによって実行し、そして大腸菌にクローン化した。

【実施例 1】

【0087】

部分的な M . ゲニタリウムゲノムのインビトロでの組み立て

天然の 5 8 0 , 0 7 6 k b の M . ゲニタリウムゲノム配列 (Mycoplasma genitalium G37 ATCC 33530 ゲノム配列 ; アクセション番号 : L43967 (Glass, J. I., et al. PNAS (US A) (2006) 103:425-430)) を、個々に合成してシーケンスするおよそ 5 から 7 k b の長さの 1 0 1 個のカセットに分割した。通常、各カセットが 1 又は数個 (several) の完全な遺伝子を含むように、カセットの境界を遺伝子の間に設置して、個々のカセットの、後における遺伝子の欠損 (ないしは削除) 又は操作を簡素化した。大部分のカセットは、それらの隣接するカセットに 8 0 b p だけ重複したが、いくつかのセグメントは、3 6 0 b p ぐらいだけ重複した。カセット 1 0 1 をカセット 1 に重複させて、それにより、円を完成させた。

【0088】

カセット 1 4、2 9、3 9、5 5、及び 6 1 の許容性トランスポゾン挿入配列 (tolerate transposon insertions) として知られる遺伝子間の部位に、短い「透かし (watermark)」配列を挿入し、天然ゲノムから合成ゲノムを区別できるようにした。さらに、アミノグリコシド耐性遺伝子を含む遺伝子 M G 4 0 8 (m s r A) 中の 2 , 5 2 0 b p の挿入配列 (insertion) を、カセット 8 9 に設置した。この毒性因子に特異的な欠損 (ないしは異常) を有する株は、哺乳動物細胞に付着 (adhere) できないことが示されており、そのため、最適な利用可能モデルシステム中の病原性が排除される。このカセットは、GENEART (Regensburg, Germany) によって合成された。全ての上記挿入配列を有する合成ゲノムは、5 8 2 , 9 7 0 b p である。

【0089】

カセット 1 から 3 1、3 6 から 3 9、5 2 から 8 8、及び 9 0 から 1 0 1 は、ブルーヘロンテクノロジー (Blue Heron Technology) (Bothell, WA) によって合成され、そして、それらの配列を確認した。カセットは、組み換えプラスミド DNA として、及びその組み換えプラスミドを保有する大腸菌クローンとしての両方が供給された。シーケンスに使用する配列 [データ]、追跡データ及び、プライマーが、各カセットに付与された。カセットは、T y p e I I S 制限酵素を用いる切断によってそれらのベクター DNA から遊離可能である。カセット 3 2 から 3 5、及び 4 0 から 5 1 は、DNA 2 . 0 (Menlo Park, CA) によって作製された。

【0090】

8 つの B - シリーズの組み立て物は、N o t I によって切断された A - シリーズのクローンから構築した。相補的な突出部分 (オーバーハング) が無く、後の反応において不活性だったので、一般的には、切断されたベクター DNA からの挿入配列をゲル精製することは必ずしも必要でなかった。4 つの A - 組み立て物から構築された B 6 2 - 7 7 を除いて、A - 組み立て物を一度に 3 つ採用して B - 組み立て物を作製した (図 3)。図 3 に示すように、4 つの C - シリーズ 1 / 4 ゲノムの組み立て物を、各々、2 つの 1 / 8 ゲノムの B - 組み立て物から構築した。正しいサイズのクローンであることを確認し、配列を確認し、そして - 8 0 で保存した。

【0091】

個々のカセット DNA 挿入配列を有する組み換えプラスミドを、適切な T y p e I I S 制限酵素で切断して、挿入 DNA を遊離させた。フェノールクロロホルム抽出及びエタノール沈殿の後に、ベクター DNA を除かずにカセットを使用した。図 3 に示すように、インビトロの組み換え反応を使用して、B A C ベクター DNA の存在下で、一度に 4 つ、カセ

10

20

30

40

50

ットを組み立てた。反応のステップでは、最初に、3'エキソクレアーゼで重複するDNA分子を消化して、重複部分を露出させ、次に、相補的な重複部分をアニール(anneal)し、そして、結合部(joints)を修復する。

【0092】

図示するために、等モル量の4つのカセットDNAと、カセット66及び69への末端の重複部分を有するリニア状(線状)のBACベクターとを共に混合することによって、66-69組み立て物を構築した。BACをBamHIクローニングサイトの近くに設置したプライマーを使用してPCR増幅して、重複部分を作製した。プライマー66(68bp)は、BamHIサイトの右側でのベクターとの20bpの重複部分、次にNotIサイト、そして、その次にカセット66の最初の40bpとの重複部分を含んだ。プライマー69(68bp)は、サイトの左側でベクターと20bp重複し、次にNotIサイト、その次にカセット69の最後の40bpとの重複部分を[含んだ]。次に、二本鎖のベクター及びカセットDNAの混合物の3'末端を、dNTP'sの不在下でT4ポリメラーゼを使用して消化し、重複部分(ないし領域)を露出させた。75℃でのインキュベーションによってT4ポリメラーゼを不活性化した後、ゆっくりと冷却して、相補的な重複部分をアニールさせた。アニールした結合部をTaqポリメラーゼとTaqリガーゼを用いて、45℃で、4つ全てのdNTP's、及びニコチンアミドアデニンジヌクレオチド(NAD)の存在下で修復した。

【0093】

図4のパネルAに示すように、dNTP'sの不在下で、T4ポリメラーゼの3'エキソヌクレアーゼ活性を用いて、4つのカセットDNA(66から69)を、それらの3'末端から十分な程度まで消化して、隣接する断片との間の重複部分(80bp)を露出させる。次にT4ポリメラーゼを、75℃で不活性化し、ゆっくりと冷却することによって相補的な重複部分をアニールさせる。次に、Taqポリメラーゼ及びdNTP'sを使用してギャップ(gaps)を埋め、そして、Taqリガーゼを用いてニックを閉じる個別の反応において、組み立て物を修復し、それによって共有結合性の組み立て物を作製する。図4のパネルBに示すように、組み立て反応のために、BamHIクローニングサイトのいずれかのサイドと20bp重複し、次にNotIサイト、そして、カセット66又は69のいずれかとの40bpの重複部分を含む2つのプライマーを使用するPCR増幅によってBACベクターを調製する。パネルCに示すように、所望の組み立て物が4つのカセットと、BACのDNAとを含有する環状DNAであるように、リニア状の増幅産物は、ゲル精製の後、パネルAの組み立て反応に含まれる。

【0094】

図5に示すように、組み立て反応のサンプルを電場反転ゲル電気泳動(field inversion gel electrophoresis: FIGE)にかけて、組み立て物の出来(success)を評価した。パネルAにおいて、A66-69に関するチューバック組み立て(chew-back assembly: CBA)反応(80µl)は、5%のPEG8000、200mMのTris-Cl pH7.5、10mMのMgCl₂、1mMのDTT、100µg/mlのBSA、4.8UのT4ポリメラーゼ(NEB)、各々150ngのカセット66、67、68及び69、そして150ngのBAC66-69のDNAを含有する250µlのPCRチューブ中で、MJ Research PTC200サーモサイクラーにおいて実行した。37℃で5分間、75℃で20分間インキュベーションし、-6℃/分で60℃まで冷却して30分間保持し、次に、-6℃/分で4℃まで冷却して保持した。修復(TRB)反応(40µl)は、10µlのチューバック反応液、40UのTaqDNAリガーゼ(NEB)、1.2UのTaqDNAポリメラーゼ(NEB)、5%のPEG8000、50mMのTris-Cl pH7.5、10mMのMgCl₂、10mMのDTT、25µg/mlのBSA、200µMの各々のdNTP's、及び1mMのNADを含んだ。45℃で15分間インキュベーションした。5µlのCBA反応のサンプル及び、20µlのTRB反応のサンプルを、0.8%E-gel(Cat. No. G5018-08, BioRad、登録商標)に載せ、U-5プログラム(2)を使用するFIGEに3時間かけた。DNAバンドは、Ge

1 D o c (BioRad、登録商標) で可視化した。DNA サイズの基準は、1 k b 伸長ラダー (extension ladder) (Invitrogen Cat. No. 10511-012) であった。

【 0 0 9 5 】

パネル B は、パネル A に示すように実行した、B 5 0 - 6 1 に関する組み立て反応を示す。A 5 0 - 5 3、A 5 4 - 5 7、及び A 5 8 - 6 1 の DNA の量は、各々およそ 4 5 0 n g であった。B A C 5 0 - 6 1 の DNA は、1 5 0 n g であった。C B A 反応のサンプルは、パネル A のように分析した。

【 0 0 9 6 】

パネル C は、パネル A に示すように実行した、C 2 5 - 4 9 に関する組み立て反応を示す。およそ 3 0 0 n g、2 5 0 n g、6 0 n g のゲルで精製した B 2 5 - 3 6、B 3 7 - 4 9、及び B A C 2 5 - 4 9 の DNA をそれぞれ使用した。1 0 μ l の C B A 反応のサンプルを B i o R a d 「Ready Agarose Mini Gel」 (Catalog 161-3016、登録商標) に載せ、H o e f f e r H E 3 3 の mini horizontal submarine electrophoresis のトレイの中で、0 . 5 μ g / m l の E t B r を含む 1 × T A E バッファーを使用して、サーキュレーション (circulation) なしで F I G E (U - 9 プログラム (2)) に 2 3 で 1 4 時間かけた。DNA サイズの基準は、低レンジ P F G マーカー (low range PFGE marker) # N O 3 5 0 S (N E B) であった。バンドは、T y p h o o n 9 4 1 0 蛍光イメージャー (Typhoon 9410 Fluorescence Imager、Amersham) を用いて、5 3 2 n m の励起波長、及び 6 1 0 n m の発光波長で可視化した。

【 0 0 9 7 】

パネル D は、パネル C において記載された U - 9 プログラムを使用する F I G E によって測定された、N o t I で切断した組み立て物の大きさを示す。

【 0 0 9 8 】

追加のサンプルを D H 1 0 B (InvitroGen)、E P I 3 0 0 (Epicentre) 及び/又は S t b l 1 4 (InvitroGen、登録商標) の細胞に電気穿孔処理し、1 2 . 5 μ g / m l のクロラムフェニコールを含む L B 寒天プレートに蒔いた。コロニーは、2 4 から 4 8 時間後に出現した。これらを採取し、3 m l のクロラムフェニコール含有 L B 培養液の中で、オーバーナイトで成長させた。プラスミド DNA を 1 . 5 m l の培養液からアルカリ溶解法を使用して調製した。次に、DNA を、N o t I で切断し、F I G E によって解析し、組み立て物の大きさが正しいことを確認した。正しいサイズを有するクローンを 1 5 % グリセロール含有 L B 培養液中で凍結し、- 8 0 で保存した。、いくつかのクローン化した組み立て物をシーケンスして、図 3 の太枠 (ボックス) によって示されるような合成の精度を確認した。

【 0 0 9 9 】

2 5 個の A - シリーズの組み立て物と、全てのより大きな組み立て物とを、E p i c e n t r e の p C C 1 B A C ベクターにクローン化した。p C C 1 B A C クローンは、E p i c e n t r e のプロトコールに従って、E P I 3 0 0 細胞において、単コピーレベル (single copy level) で増殖させることができ、次に、細胞あたり 1 0 コピーに誘導できた。誘導した 1 0 0 m l の培養物は、2 0 0 μ g までプラスミド DNA を産生した。切断が各末端に付与した N o t I サイトの部分に有する挿入 DNA 切断を効率的に産出するように、B A C 中の組み立て挿入配列は、各端に N o t I サイトに近接して隣り合わせた (M . ゲニタリウムゲノムは N o t I サイトを含まない) 。N o t I が隣接する組み立て物をより大きな (higher) 組み立て物に使用する場合には、N o t I サイトの 3 ´ 部分 (2 個のヌクレオチド) を、チューバック反応によって除去した。図 6 に示すように、N o t I サイトの 5 ´ 部分は、アニーリングの後、6 個のヌクレオチドの突出部分 (overhang) を産出したが、その突出部分を、T a q ポリメラーゼの 5 ´ エキソヌクレアーゼ活性による修復の際に、除去した。

【 実施例 2 】

【 0 1 0 0 】

酵母におけるインピボでの組み換え

10

20

30

40

50

半分のゲノムクローンは、上記のインビトロ組み換え法では、大腸菌において増殖できなかった。C78-101クローンでさえ、Stb14（登録商標）大腸菌細胞中を除いては、維持することが難しかった。そのため、出芽酵母（*S. cerevisiae*）を、クローニングの宿主として使用した。

【0101】

リニア状のYACクローンは、通常、制限酵素クローニングサイトへの挿入配列の連結によって構築される(Burke, D. T., et al., Science, (1987) 236:806-812)。この方法の改良法は、重複する挿入配列及びベクターDNAの、それらを相同組み換えによって連結する酵母スフェロプラストへの同時形質導入(co-transfection)を使用することである(図7A)。これは、環状クローンを産出し、TARクローニングとして知られる(Lario 10 nov, V., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1996) 93:491-496)。リニア状のYACのようなTARクローンは、セントロメアを含むため、ネイティブの酵母ゲノムと同じ(ないし沿った)染色体コピー数で維持される。環状のTARクローンは、リニア状の酵母染色体からのそれらの分離を容易にする。

【0102】

図7のパネルAは、TARクローニングに使用したベクターを示す。それは、BAC及びYAC配列(目盛に示される)の両方を含む。ベクターと挿入配列の組み換えは、PCR増幅によりTARBACに加えられた「フック(hooks)」で生じる。複製起点(ARS)様の配列(Newlon, C. S., et al., Curr. Opin. Genet. Dev. (1993) 3:752-758)がM.ゲニタリウムゲノム中に存在しないので、酵母の複製起点は、クローンが増殖できる 20 ようにする。酵母における選択は、宿主株におけるヒスチジン栄養要求性の補完によって実行される。BAC配列は、電気穿孔法によって大腸菌に導入される可能性を酵母から精製したクローンに付与する。

【0103】

酵母内で、1/4(quarter)ゲノムを半分[のゲノム]及び全体[のゲノム]へ組み立てるために、pTARBAC3ベクター(Zeng, C., et al., Genomics (2001) 11:27-34)を使用した。このベクターは、YAC及びBACの配列の両方を含む(図7A)。このベクターを、BACベクターのための上記手法(strategy)と同様の手法を使用して調製した。1つの1/4ゲノムの内の単一の切断制限サイトの両サイドとの60bpの重複部分と、その後ベクター末端からNotIサイト及び20bpとを含むプライマーを使用 30 するPCR増幅によって、末端部分において重複部分を作製した。ベクターを、3番目の1/4[ゲノム]であるC50-77内の遺伝子間BsmBIサイトに挿入した。TARクローニングにおいて、二本鎖切断での組み換えは、およそ20倍刺激される(Leem, S. H., et al., nucleic Acids Res. (2003) 31 :E29)。形質転換されるDNAは、6つの断片(ベクター、3番目の1/4ゲノムの2つの断片、及び1、2及び4番目の1/4ゲノムの断片)から構成される。pTARBAC3中の挿入配列として全長ゲノムを得るためには、単一の酵母細胞が、6つの全ての断片を取り込み、相同組み換えによってそれらを組み立てなければならない。

【0104】

図7のパネルBは、M.ゲニタリウムJCVI-1.0の1/4ゲノムの組み立てを示す。これらは、出芽酵母に共形質転換するために、大腸菌から精製し、NotI消化した後、TARBACベクターと混合し、60-264bpの重複部分での組み換えが6つの断片を単一のクローンへと結合させた。TARBACを、C50-77のBsmBIサイトに挿入した。 40

【0105】

酵母細胞の形質転換は、公開された方法(Kouprina, N., et al., Methods Mol. Biol. (2006) 349:85-101)を使用して実行した。酵母細胞を、オーバーナイトで培養した培地から回収し、そして、水で洗浄し、次に1Mのソルビトールで洗浄した。1Mのソルビトールの存在下で、ザイモリエース(Zymolyase、登録商標)及びβ-メルカプトエタノール 50 処理することによって、細胞をスフェロプラストに転換した。スフェロプラストをソルビ

トールで洗浄し、ソルビトール及びCaCl₂を含むバッファーに再懸濁した。元の5 mlの酵母の培養液に相当するスフェロプラストを、200 µlの容量において、室温で10分間、10 ngのベクター及び120 ngの各々の1/4ゲノムとインキュベーションした。次に800 µlの20%ポリエチレングリコール(PEG)8000(US Biochemicals)を加え、10分間インキュベーションを継続した。富栄養培地に回収した後、ヒスチジン不在下のソルビトールプレート上の上層寒天(top agar)において、30で形質転換した細胞を選択した。最初にPCRによって、次にサザンブロットによって形質転換体をスクリーニングした(図7C)。

【0106】

パネルCでは、最初は、PCRによってTARクローンをスクリーニングした。次に、全ての挿入断片の増幅に関してポジティブなクローンをサザンブロットによって特徴付けた。全ての酵母DNAを、アガロースプラグ中で調製し(BioRad CHEF DRIIIマニュアルプロトコルにより)、NotIで消化してM. ゲニタリウムの配列からベクターを分離し、パルスフィールドゲル電気泳動(Bio Rad CHEF DRII or DRIII)によって分離し、吸引(vacuum)(BioRad Model 785 Vacuum Blotter)によってアマシャムハイボンドN+膜に転写し、9つのM. ゲニタリウムのMgPα反復部分の中にハイブリダイズする2つのジゴキシゲニン標識された(Roche)PCR産物の混合物でプローブし、AP標識の抗ジゴキシゲニンFab断片の後に、蛍光基質HNPP(Roche)で検出した。望ましいクローンは、ネイティブなM. ゲニタリウムゲノムのアガロースプラグから分離した染色体と同じ大きさの単一のバンドを示した。ここでは、パルスフィールド電気泳動による、シーケンスした最終クローンのより詳細な消化分析を示す。電気泳動のレーンは以下の通りである：1) 低レンジパルスフィールドゲルマーカー(NEB)、2) 消化していない宿主酵母株VL6-48N(Larionov, V., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1997) 94:7384-7387)、ネイティブなM. ゲニタリウム MG408(このゲノムは、環状であるが、アガロースプラグ中の分子の分画は破壊され、これらリニア状の分子はおよそ600 bpにおいて電気泳動され、TARクローン用のサイズマーカー及びブロットシグナルコントロールを提供する)、4) 消化していない酵母株sMgTARBAC37、5) NotIで消化した酵母株sMgTARBAC37。600 kbの環状物は、大きすぎて、ゲルの中で電気泳動できないので、レーン4は、クローンのトポロジーを示す。クローンの小さい分画は、破壊されており、これらリニア状の分子はかすかなブロットシグナル状態で検出される。レーン5における、NotIで消化されたサンプルは、TARBACベクターから分離された挿入M. ゲニタリウムDNAの大きさを示す。

【0107】

PCR及びサザンブロットによるポジティブなクローンを、更なるサブクローンのサザンブロットによって安定性に関してテストした。これら2つの分析に基づくと、およそ10%の形質転換体のコロニーが、完全な合成ゲノムを保有した。これらのクローンの1つである、sMgTARBAC37をシーケンス用に選択した。

【0108】

さらに、TARクローニングを、2つの隣接する1/4ゲノムの4つのセットの各々を用いて、そして、1から3番目の1/4ゲノムを用いて実行した。これら多種の実験の形質転換体からのDNAを単離し、そして大腸菌に電気穿孔処理した(Silverman, G. A., Methods Mol. Biol. (1996) 54:65-68)。この方法では、本願発明者らは、D1-49、D50-101、そして組み立て物25-77及び1-77であることが予測される大きさのBACクローンを得た。そのうち、D1-49をシーケンス用に選択したところ、正確だった。

【実施例3】

【0109】

酵母からの合成M. ゲニタリウムゲノムの回収及びその配列の確認

sMgTARBAC37のアガロースプラグを、酵母用のBioRad CHEFマニュアルプロトコルに従って、0.5のODまで30で培養した1.5 LのCM-HI

10

20

30

40

50

S 培養液から調製した。プラグを洗浄し、1 × NEB バッファー 4 の中で透析し、そしてオーバーナイトで、37 で、酵母を切断するが s M g T A R B A C 3 7 は切断しない制限酵素 R s r I I、F s e I、及び A s i S I と共にインキュベーションした。4 . 5 V / c m で 2 時間のアガロースゲル電気泳動によって消化したリニア状の酵母 D N A をプラグから除去した。無傷の環状 s M G T A R B A C 3 7 の D N A は、これら条件下ではプラグ内に残った。1 つのプラグを N o t I と共にインキュベートし、そして、プラグ中の D N A を電気泳動によって解析して、s M g T A R B A C 3 7 の D N A のサイズ及び純度を評価した。ゲルは、S Y B R ゴールドで染色した。

【 0 1 1 0 】

図 8 は、N o t I で消化したおよそ 5 9 0 k b のバンドを示すが、未消化のコントロールにはバンドがない。s M g T A R B A C 3 7 の D N A は、X カバー領域 (X coverage) をシーケンスして、設計されたようになったことを確認した。

10

【 実施例 4 】

【 0 1 1 1 】

酵母における 2 5 個の D N A 断片の組み立て

採用した D N A 断片は、マイコプラズマ・ゲニタリウムゲノムの重複部分であり、Gibson, D. G., et al., Science (2008) 319:1215-1220 (前記) に、詳細に記載される。

【 0 1 1 2 】

A . A - シリーズの組み立て物の作製 :

テーブル 1 に示した 2 5 個の A - シリーズの組み立て物の各々は、p C C 1 B A C (登録商標) 中に含まれ、E P I 3 0 0 大腸菌株 (Epicentre、登録商標) において増殖した。

20

[表 1]

M . ゲニタリウム J C V I - 1 . 1 合成ゲノムの構築に使用した 2 5 個の A - シリーズの組み立て物の概要

組み立て物	サイズ	ベクターを放出する ために必要な消化	5'末端における隣 接する組み立て物へ の重複部分の大きさ	3'末端における隣 接する組み立て物へ の重複部分の大きさ	
A1-4	23,636 bp	Bsm BI	80 bp	80 bp	
A5-8	26,166 bp	Not I	80 bp	80 bp	
A9-12	23,872 bp	Bsm BI	80 bp	80 bp	
A13-16	23,653 bp	Sal I 及び Not I	80 bp	80 bp	
A17-20	23,312 bp	Not I	80 bp	80 bp	
A21-24	23,211 bp	Not I	80 bp	80 bp	10
A25-28	24,992 bp	Not I	80 bp	80 bp	
A29-32	26,257 bp	Not I	80 bp	209 bp	
A33-36	20,448 bp	Not I	209 bp	80 bp	
A37-41	25,706 bp	Not I	80 bp	257 bp	
A42-45	19,223 bp	Not I	257 bp	257 bp	
A46-49	19,895 bp	Not I	257 bp	257 bp	
A50-53	24,390 bp	Not I	257 bp	80 bp	
A54-57	24,789 bp	Not I	80 bp	80 bp	20
A58-61	24,534 bp	Not I	80 bp	80 bp	
A62-65	25,055 bp	Not I	80 bp	80 bp	
A66-69	23,128 bp	Not I	80 bp	80 bp	
A70-73	23,345 bp	Not I	80 bp	80 bp	
A74-77	21,396 bp	Not I	80 bp	165 bp	
A78-81	22,320 bp	Not I	165 bp	360 bp	
A82-85	23,460 bp	Not I	360 bp	85 bp	
A86-89変異体	34,950 bp	Not I	85 bp	80 bp	
A90-93	23,443 bp	Not I	80 bp	80 bp	30
A94-97	24,511 bp	Not I	80 bp	80 bp	
A98-101	17,372 bp	Not I	80 bp	80 bp	

【 0 1 1 3 】

必須でない遺伝子内に挿入されたベクターを有する、公開された詳細と比較した A 8 6 - 8 9 の変異体を使用した。ベクターは、酵母中における選択及び維持のための、ヒスチジン栄養要求性マーカー、セントロメア、そして複製起点を含む。酵母増殖因子を有するベクターを包含することは、組み立て物の結果の評価を可能にする。

【 0 1 1 4 】

該クローニングシステムは、細胞あたり、10コピー以上のBACを許容する。これらの25個の組み立て物を有する大腸菌株を12.5 µg/mlのクロラムフェニコール、及び1x誘導溶液(Epicentre、登録商標)を含有する150 mLのLBに植菌し、そして37℃で、16時間インキュベーションした。培養液を回収し、BACをQiagenのHiSpeed Plasmid Maxi Kitを使用して精製した。DNAを500 µlのTEバッファーを使用して溶出した。BACから断片を遊離させるために、制限消化を37℃で16時間実行し、そしてフェノール、クロロホルム抽出及びエタノール沈殿によって終了させた。産物をTEバッファーに、120 ng/µlの最終濃度まで溶解した。

【 0 1 1 5 】

消化[サイト]の次に、25個の組み立て物の各々は、いずれかの端(either end)に

10

20

30

40

50

目的の隣接する分子との少なくとも80bpの重複配列を有する。

【0116】

B. 酵母スフェロプラストの形質転換：

V L 6 4 8 N 酵母株(Kouprina, N., et al., 前記)を使用して、酵母細胞をザイモリエース(登録商標)で処理して細胞壁を弱くし、コンピテント化して、PEG及びCaCl₂での処理によって、外来DNAを取り込ませた。細胞は、酵母スフェロプラストの調製の前に、1.3のOD₆₀₀($\sim 5 \times 10^7$ cells/ml)まで成長させた。消化した25個のA-シリーズの組み立て物をそれぞれ96ng(120ng/ μ lを0.8 μ l)の添加によってプールし、そして $\sim 10^8$ 個の酵母スフェロプラストと混合した。 ~ 100 ng又は $\sim 4 \times 10^9$ のゲノムに相当する、節(ないしパラグラフ)Aからの等量の各々消化された断片を、ゲル精製せずにプールした。およそ 10^8 個の酵母スフェロプラストをこのDNAプールに加え、酵母形質転換を実行した(Kouprina, N., et al., Nat. Protoc. (2008) 3:371-377)。これは、 ~ 40 個のM.ゲニタリウムゲノムに相当するか、あるいは、酵母スフェロプラストあたり、 ~ 1000 個のDNA分子(40×25)の量である。形質転換の次に、酵母スフェロプラストを再び作製し、ヒスチジンを含まない完全補充培地(CSM-His)にアデニンと1Mのソルビトールとを添加した寒天プレート上で3日間30℃で選別した。3日間、30℃で選択培地でインキュベーションした後に、およそ800個のコロニーを得た。次に、各コロニーを小さい(small)パッチのようにCMS-His寒天プレート上に移し、2日間30℃でインキュベーションした。一度選別して、所望の組み立て物を有することを確認した、これらプレートからの個々のコロニーを解析した。

【0117】

全体の過程を図9に示す。図9に示すように、酵母細胞を、M.ゲニタリウムゲノムを含む25個の異なる重複A-シリーズのDNAセグメント(それぞれ、 ~ 17 kbから ~ 35 kb)で形質転換した。これらを完全なゲノムに組み立てるためには、単一の酵母細胞は、25個の異なったDNA断片の少なくとも1つの代表的な断片を取り込み、相同組み換えを実行する核に各々を組み込まなければならない。図9のJC VI-1.1で標識された組み立てゲノムは、ベクター配列(三角形)の中に示したA86-89を含む590,011bpである。上記のように、ベクター内に含まれる酵母の増殖因子は、複製起点(ARSH4)、セントロメア(Cen6)、そしてヒスチジン選択可能マーカー(His3)である。

【0118】

C. 多重の(multiplex)PCR解析：

DNAを、ChargeSwitch Plasmid Yeast Mini Kit(Invitrogen、カタログ番号CS10203、登録商標)を用いて、提供されたマニュアルに従って、培養した酵母細胞から抽出した。多重PCRを、10 μ lの反応で、PCRバッファー、dNTP's混合物、及びホットスタートDNAポリメラーゼ(Qiagen、カタログ番号206143)を含むマスターミックスを使用して実行した。2 μ lのDNA及び、20個のオリゴを各々5 μ Mで含有する1 μ lの10 \times プライマーストック、を各反応に添加した。サイクルのパラメーターは、94℃で15分間、次に、94℃で30秒間、45℃(プライマーセット1)又は55℃(プライマーセット2-4)で90秒間、72℃で90秒間の35サイクル、その後、1回の72℃での3分間のインキュベーションである。2 μ lの各反応液を2%のE-gel(Invitrogen)に載せ、72Vを30分適用した。バンドは、Amersham Typhoon 9410 蛍光イメージャーを使用して可視化した。

【0119】

本願発明者らは、最初に全ての25個の断片を取り込んだ酵母細胞についてスクリーニングした。大きさが100bpから1075bpにわたる単位複製配列(amplicon)を生産する40個のプライマー対を、4個の別個の多重PCR反応の各々においてそれらが10個の単位複製配列を生産できるように設計した。多重プライマーセット1及び2は、既に開示した(Gibson, D. G., et al., 前記)。40個の単位複製配列は、M.ゲニタリウムゲ

ノムにわたって、およそ15 kbごとに位置する。PCRによって全ての40個の単位複製配列が生じるためには、全ての25個のセグメントが存在することが必要であり、そのため、全ての25個の断片が酵母細胞に取り込まれたことについての非常に良い兆候(indication)を提供する。これは、図10A-10Bに図示される。図10Aに示すように、40個の単位複製配列を、10個の産物が、4個の別個の多重PCR反応において生産できるように設計した(セット1-セット4)。図10Bに示すように、40個のセットのプライマーは、およそ15 kbごとに1つのM.ゲニタリウムゲノムの小さな部分をそれぞれ増幅する。25個の各セグメント(矢印)は、40個の単位複製配列(線として示す)の少なくとも1つに関するプライマー結合部位を提供する。10個の個々のコロニーを、単一の選択プレートに小さなパッチとして移した。30で2日間のインキュベーションの後、これら各10個のパッチからのおよそ 10^7 の細胞を1 mlの水に採取した(scraped)。多重プライマーセット1及びこれら10個のコロニーから抽出したDNAを使用して、多重PCRを実行し、ゲル電気泳動により解析した。クローン1及び4は、10個全ての単位複製配列を生産した。単位複製配列1-hは、露光時間を増加した場合に観察することができる弱いシグナルを与えた(データは示さない)。このPCR解析は、クローン1及び4における25個のA-シリーズの組み立て物の10個の存在を証明した。

10

【0120】

100 bpから1075 bpの範囲の大きさのPCR産物は、2%アガロースゲルの電気泳動によって容易に分離することができる。図10Cに示す結果において、DNAは、10個の酵母クローンから抽出し、プライマーセット1を使用する多重PCRを実行した。クローン1及び4(c1及びc4)は、10個の予測される単位複製配列(アンプリコン)の中で、9個を効率的に生産した。単位複製配列1-hは、ゲルから発するシグナルを増加した場合に、観察することができた。

20

【0121】

D. クローン4の詳細な解析

多重プライマーセット1-4を使用して多重PCRを実行し、ゲル電気泳動によって解析した。全ての40個のPCR産物は、単位複製配列1-hを除いて、クローン4から抽出したDNAから効率的に生産された。このことは、全て25個のA-シリーズの組み立て物の存在を証明する(図10Bと比較)。A70-73は、単位複製配列1-h及び3-hによって表される。単位複製配列1-hは、他の単位複製配列と比較して低レベルで生産されるが、単位複製配列3-hは、効率的に生産されたため、クローン4中のA70-73の存在の強力な証拠が提供される。クローン4を、更なる解析用に選択した。図10Dに示した結果において、多重PCRを、全ての4つのプライマーセットを使用して、クローン4に対して実行した。単位複製配列1-hを除く全ての40個の単位複製配列を、このクローンから効率的に生産することができた。「L」でラベルした列に、100 bp ラダー(NEB)を載せ、そしてサイズを示した。

30

【0122】

E. 合成M.ゲニタリウムゲノムJCVI-1.1の制限解析

Bio Rad Yeast DNA Plug Kitを使用し、そして提供された指示マニュアルに従って(カタログ番号 170-3593)クローンから1%アガロースにDNAを調製した。このプロトコールの完了した後に、プラグをhorizontal submarine electrophoresisトレイ中で、1 x TAEに浸し、5.4 V/cmを2時間適用した。プラグは、Bio Radマニュアルに従って、Eag I、Bss HII又はAat IIで消化した(制限酵素及びバッファーはNEBによって供給された)。37で16時間インキュベーションした後、同量の各プラグ(およそ20 µl)を、1%のBio Radのレディーアガロースミニゲル(Bio Rad Ready Agarose Mini Gels(登録商標))に載せ、そして、Hoefer HE33(登録商標)のmini horizontal submarine electrophoresisトレイの中で、0.5 µg/mlのエチジウムブロマイドを含有する1 x TAEバッファーを使用して、U-2プログラムを使用して、循環なしで、電場反転ゲル電気泳動(FIGE)に、23で14時間供した。FIGE U-2に関するパラメーターは、前進90 V、初期のスイッチ5.0秒、最終的なス

40

50

イッチ 30 秒、リニア状の傾斜、そして逆行 60 V、初期のスイッチ 5.0 秒、最終的なスイッチ 30 秒である。バンドは、Typhoon 9410 蛍光イメージャー (Amersham、登録商標) を用いて、532 nm の励起波長、610 nm の発光波長で可視化した。

【0123】

全ての 25 個の断片がクローン 4 において完全なゲノムに組み立てられたことを確認するために、上述のように、制限分析用のアガロースプラグ内のこれらの酵母細胞から DNA を調製した。ネガティブコントロールとして、DNA を形質転換していない宿主株のからも抽出した。プラグ中の環状ゲノムを濃縮するために、大部分のリニア状の酵母染色体 DNA を、定電圧電気泳動によって除去した。図 11C に示すように、Eag I、Bss HII 及び Aat II で消化した後に、消化されたプラグを電場反転ゲル電気泳動に供した場合には、完全なゲノム組み立て物のこれらの消化物によって予測される 5 つの制限断片が確認された。宿主酵母コントロールは、これらのバンドを示さず、150 kb 未満の DNA のスミアのみを示した。このスミアは、組み立てられたゲノムの他の予測される断片を不明瞭にしただろう。多重 PCR 解析 (図 10) と共に、これら結果は、クローン 4 が、少なくとも 25 個の DNA の重複するセグメントを取り込み、そしてインビボで、それらを組み換えた結果、組み立てられた JCVI-1.1 合成ゲノムを有することを示す。

10

【0124】

クローン 1 は、プライマーセット 1 を用いて増幅した多重 PCR 産物を分析した場合には、クローン 4 と同様のパターンを生じた (図 10C)。従って、本願発明者らは、更にクローン 1 を分析した。図 10 で示した 4 つの多重 PCR プライマーセットを使用して、全ての 40 個の単位複製配列がクローン 1 について確認され、そして、図 11 に示すように Eag I 消化の後に、図 12 に示すように予想される 590 kb のバンドが存在する。

20

【0125】

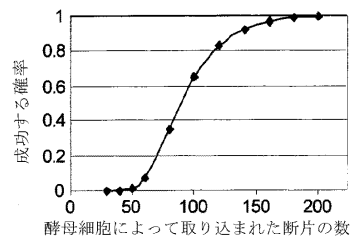
図 12A において、図 10 のように、全ての 4 つのプライマーセットを使用してクローン 1 から抽出した DNA に多重 PCR を実行した。2% アガロースゲルの電気泳動の後に、全ての 40 個の単位複製配列が確認された。次に、図 12B において、クローン 1 からアガロースプラグ中の DNA を調製し、次に Eag I で消化して、図 11 のように解析した。1% アガロースゲルを用いた電場反転ゲル電気泳動の後に、予想される 590 kb のバンドを確認することができる (* によって示される)。

30

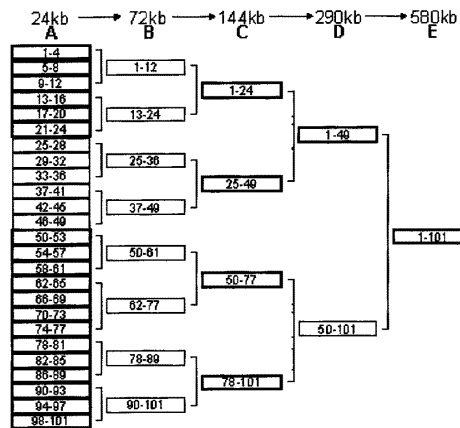
【0126】

従って、解析した 10 個の酵母クローンの内で、2 個が完全なゲノムを含む。

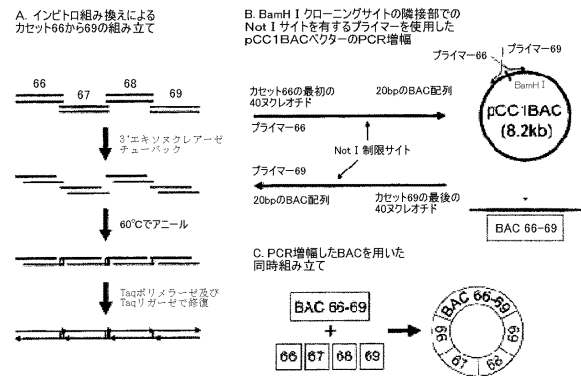
【図 1】



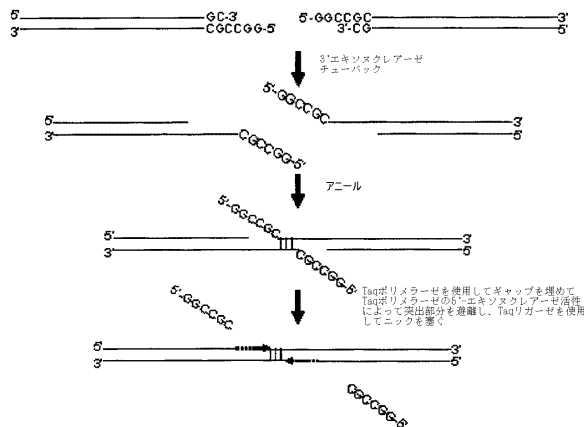
【図 3】



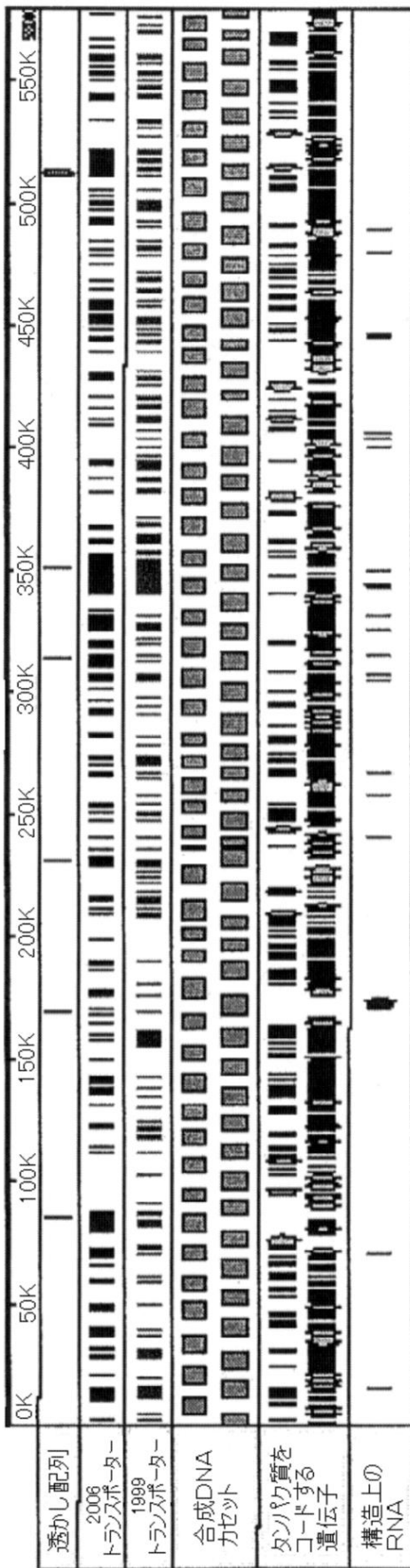
【図 4】



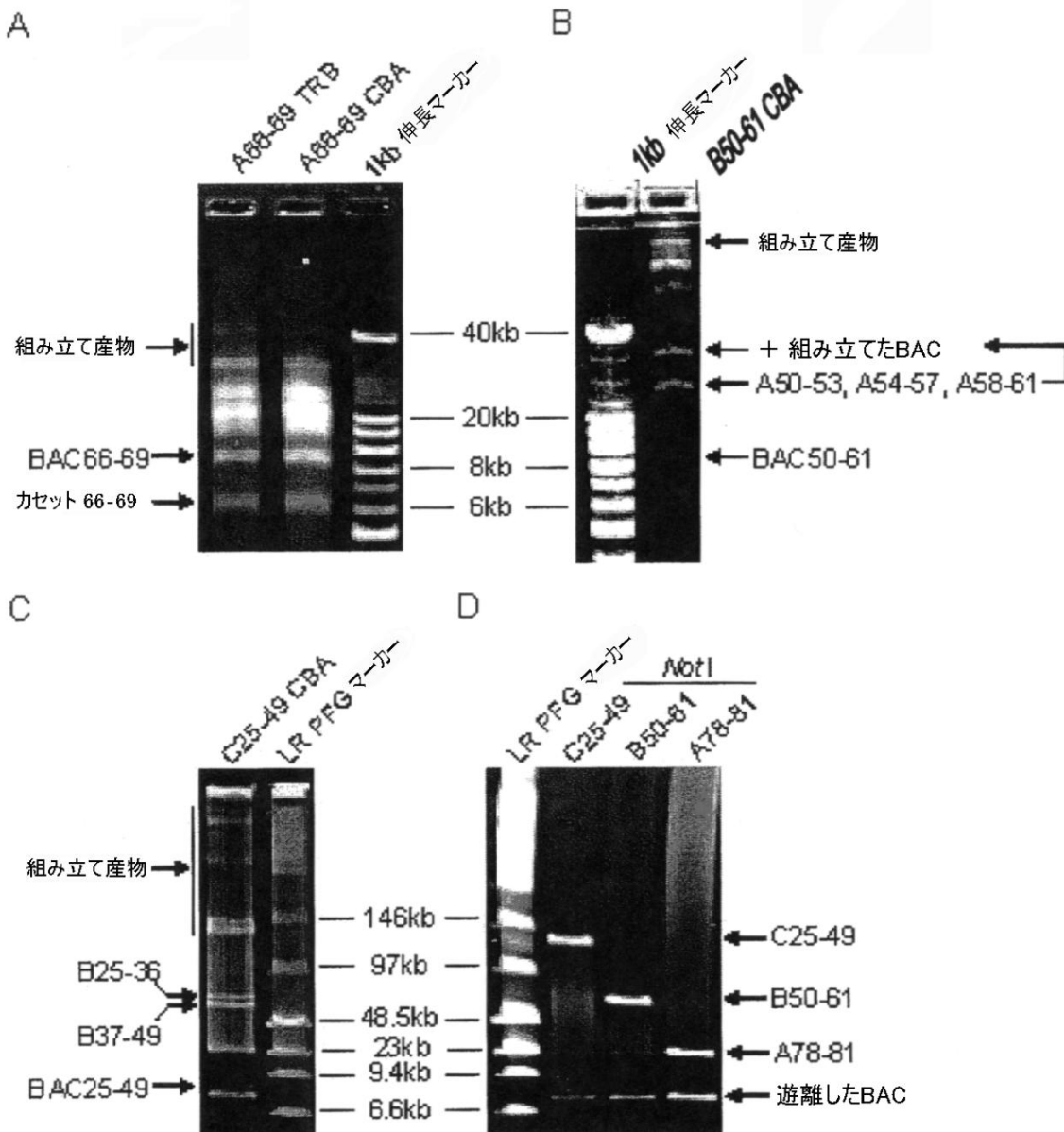
【図 6】



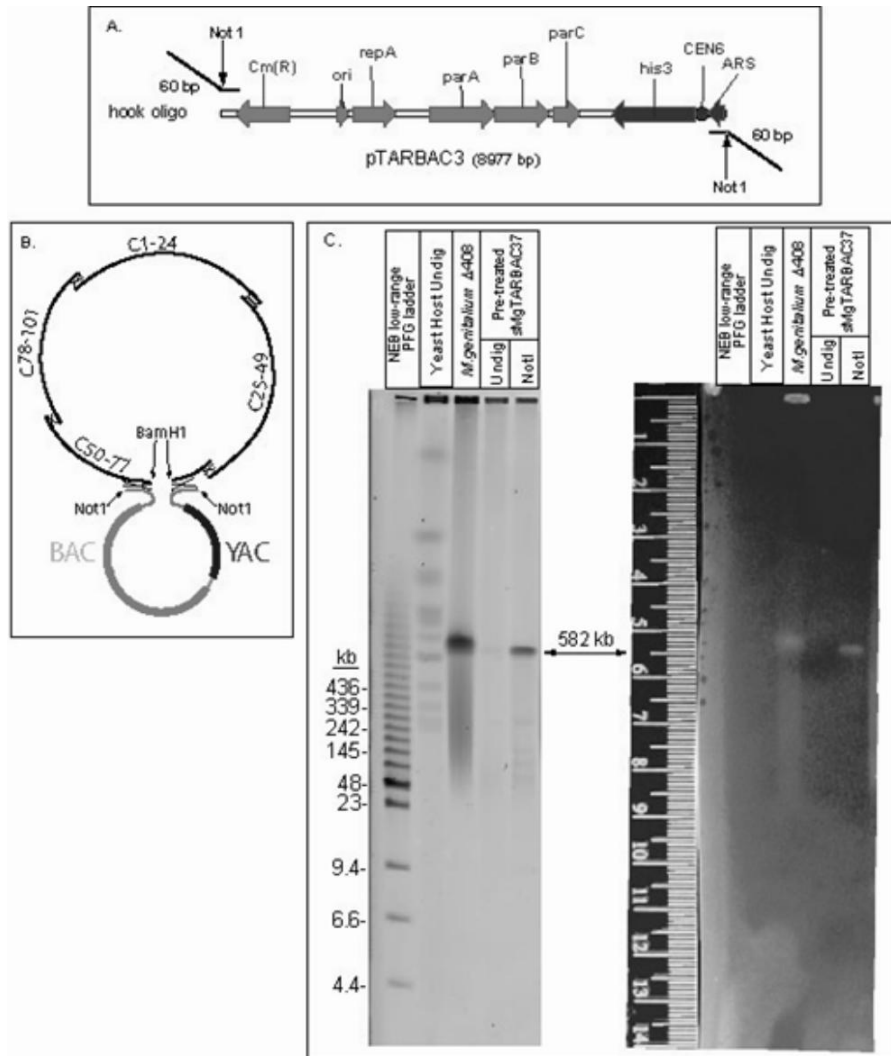
【図2】



【図5】



【 図 7 】



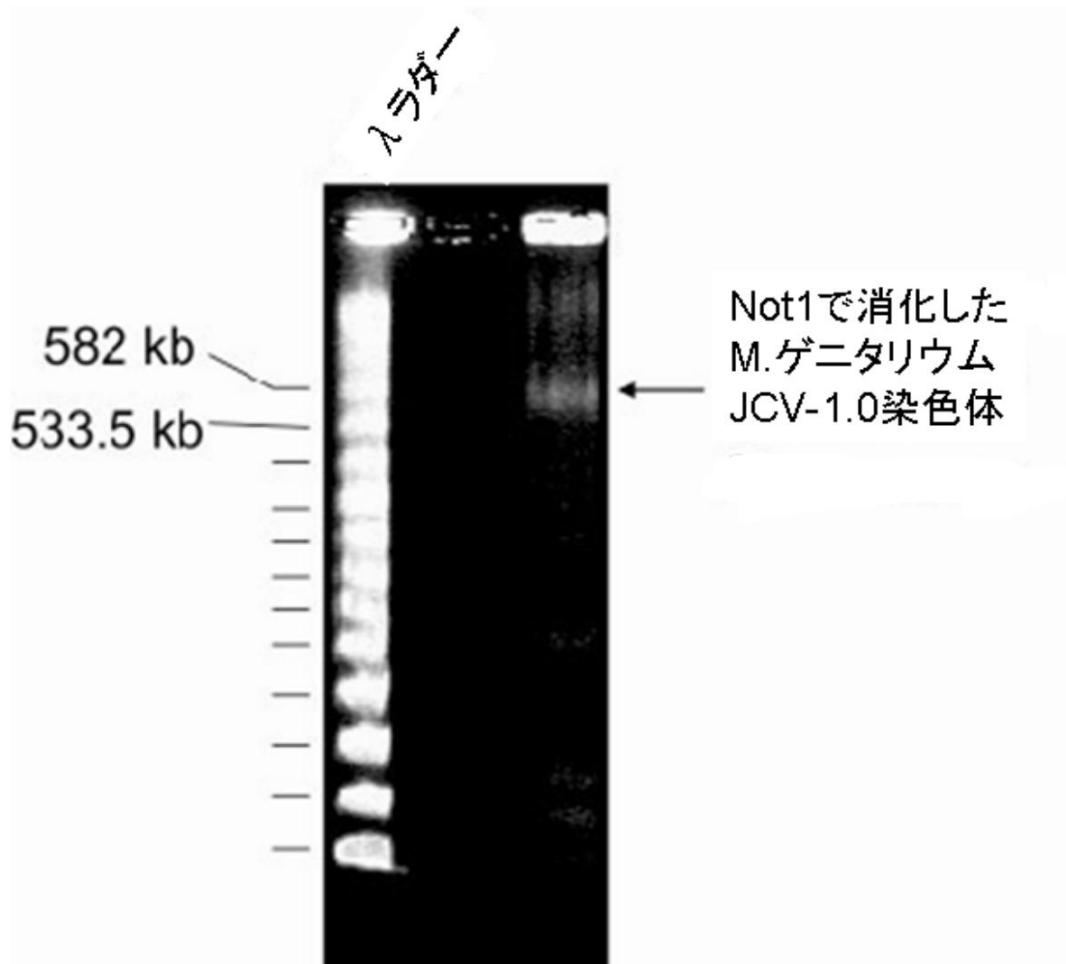
NEB low-range PFG ladder : NEB 低レンジ PFG ラダー

Yeast Host Undig : 未消化の宿主酵母

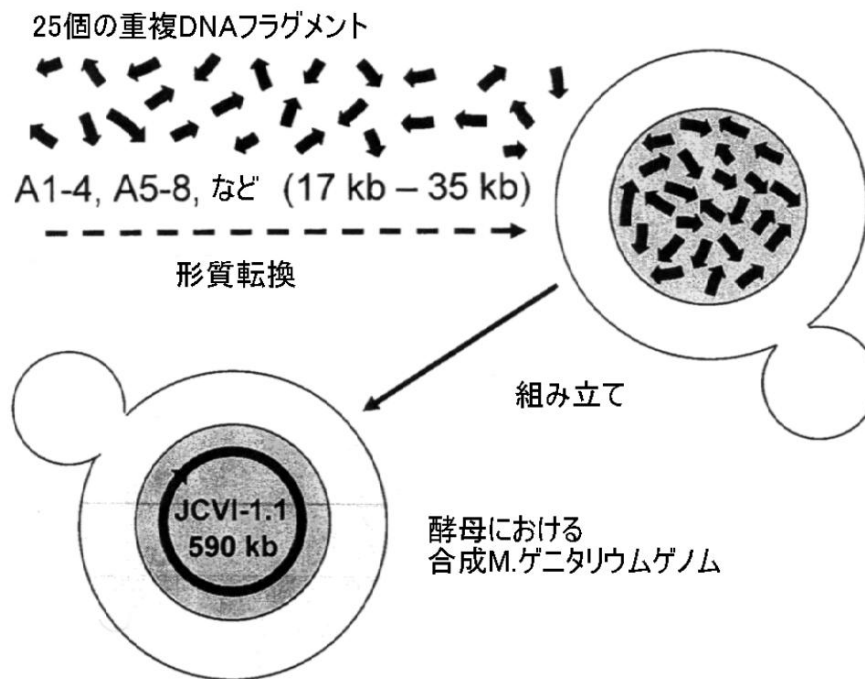
M. genitalium Δ 408 : *M. ゲニタリウム* Δ 408

Undig : 未消化

【図 8】



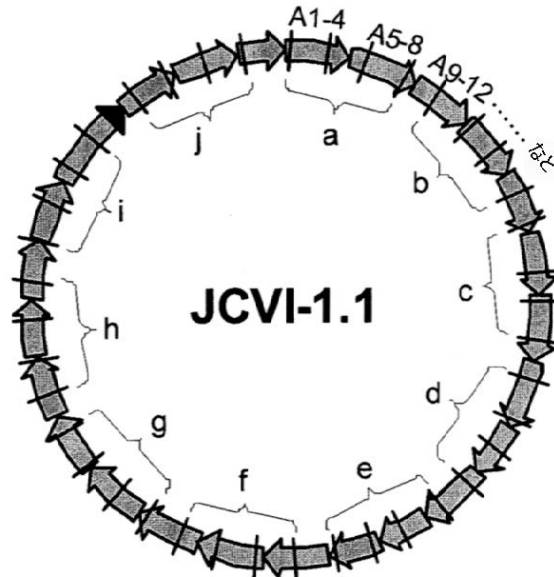
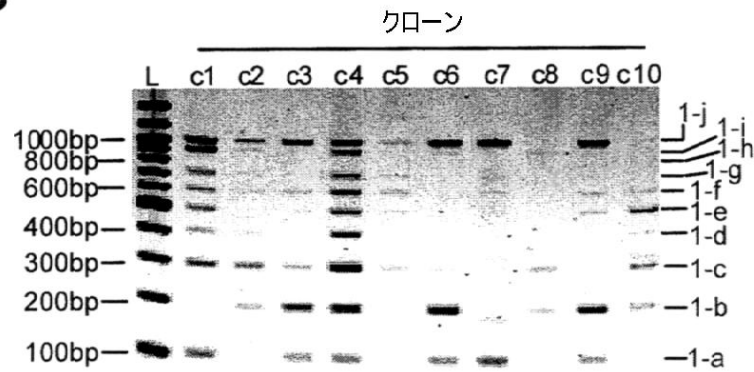
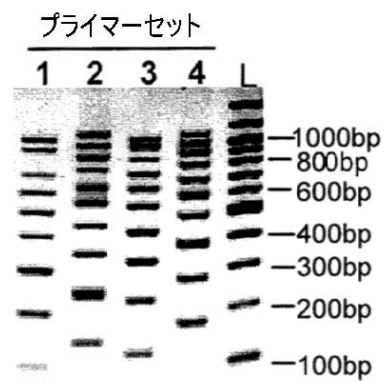
【図9】



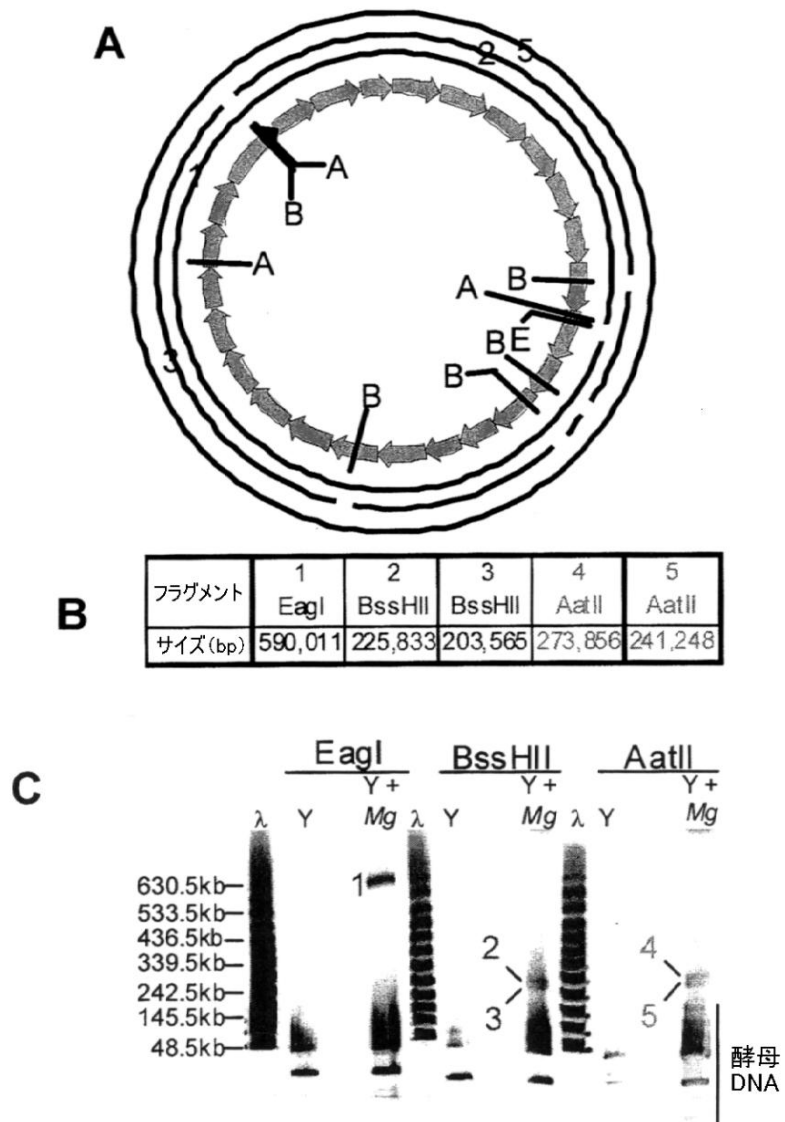
【図10】

A

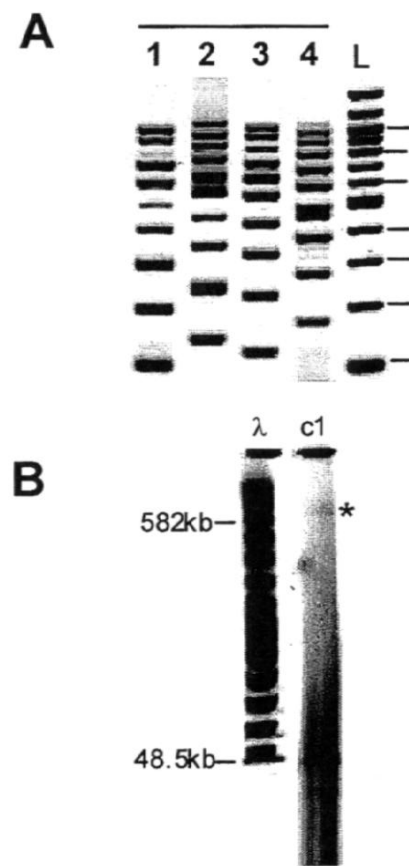
アンプリコン	a	b	c	d	e	f	g	h	i	j
セット1の大きさ(bp)	100	200	300	400	500	600	700	800	900	1000
セット2の大きさ(bp)	146	250	348	450	550	650	750	850	950	1050
セット3の大きさ(bp)	125	225	325	425	525	625	725	825	925	1025
セット4の大きさ(bp)	175	275	375	475	575	675	775	875	975	1075

B**C****D**

【図 11】



【図 1 2】



【配列表】

0005618413000001.app

フロントページの続き

- (31)優先権主張番号 61/062,214
(32)優先日 平成20年1月23日(2008.1.23)
(33)優先権主張国 米国(US)
(31)優先権主張番号 61/023,392
(32)優先日 平成20年1月24日(2008.1.24)
(33)優先権主張国 米国(US)
(31)優先権主張番号 61/096,270
(32)優先日 平成20年9月11日(2008.9.11)
(33)優先権主張国 米国(US)

前置審査

- (74)代理人 100142929
弁理士 井上 隆一
(74)代理人 100148699
弁理士 佐藤 利光
(74)代理人 100128048
弁理士 新見 浩一
(74)代理人 100129506
弁理士 小林 智彦
(74)代理人 100130845
弁理士 渡邊 伸一
(74)代理人 100114340
弁理士 大関 雅人
(74)代理人 100114889
弁理士 五十嵐 義弘
(74)代理人 100121072
弁理士 川本 和弥
(72)発明者 ギブソン、ダニエル ジー .
アメリカ合衆国 9 2 0 3 7 カリフォルニア、ラ ホヤ、スイート 1 0 0、エヌ、トーリー
パインズ ロード 1 1 1 4 9
(72)発明者 ベンダーズ、グウィネス エー .
アメリカ合衆国 9 2 0 3 7 カリフォルニア、ラ ホヤ、スイート 1 0 0、エヌ、トーリー
パインズ ロード 1 1 1 4 9
(72)発明者 ヤング、レイ
アメリカ合衆国 9 2 0 3 7 カリフォルニア、ラ ホヤ、スイート 1 0 0、エヌ、トーリー
パインズ ロード 1 1 1 4 9
(72)発明者 グラス、ジョン アイ .
アメリカ合衆国 9 2 0 3 7 カリフォルニア、ラ ホヤ、スイート 1 0 0、エヌ、トーリー
パインズ ロード 1 1 1 4 9
(72)発明者 ベンター、ジェイ . クレイグ
アメリカ合衆国 9 2 0 3 7 カリフォルニア、ラ ホヤ、スイート 1 0 0、エヌ、トーリー
パインズ ロード 1 1 1 4 9
(72)発明者 ハッチンソン、III、クライド エー .
アメリカ合衆国 9 2 0 3 7 カリフォルニア、ラ ホヤ、スイート 1 0 0、エヌ、トーリー
パインズ ロード 1 1 1 4 9
(72)発明者 スミス、ハミルトン オー .
アメリカ合衆国 9 2 0 3 7 カリフォルニア、ラ ホヤ、スイート 1 0 0、エヌ、トーリー

パインズ ロード 11149

審査官 戸来 幸男

- (56)参考文献 米国特許第05976846 (US, A)
国際公開第2007/032837 (WO, A2)
国際公開第2007/047148 (WO, A1)
Science, 2008年 1月24日, vol.319, no.5867, pp.1215-1220

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C12N 15/00 - 15/90
CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/
WPIDS (STN)
JSTPLUS/JMEDPLUS/JST7580 (JDreamIII)
PubMed